

申 报	系列：教学科研
	专业：特种经济动物饲养
	职称：副教授

业绩成果材料

（申报人的业绩成果材料包括论文、科研项目、获奖以及其他成果等）

单 位（二级单位） 动物科学学院

姓 名 易辉玉

材料核对人：

单位盖章：

核对时间：

华南农业大学制

目 录

一、教学研究业绩

1. 教改论文：浅谈蚕桑生物技术课程教学..... 4
2. 教学成果佐证材料
 - 2.1. 主持：校级一流课程《桑树学》 12
 - 2.2. 参加：省级一流课程《蚕业资源综合利用》 16
3. 编写教材
 - 3.1. 副主编：《蚕桑生物技术实验指南》 22
 - 3.2. 参编：“十三五”规划教材《蚕桑产品深加工技术》. 29
 - 3.3. 参编：“十四五”规划教材《生物化学》 36
 - 3.4. 参编：数字教材《生物化学》 44

二、科研项目

1. 主持
 - 1.1. 关于“家蚕钙蛋白酶 calpain 参与切割自噬 — 凋亡开关蛋白 BmATG6 的研究”项目资助批准的通知..... 48
 - 1.2. “钙蛋白酶参与调控家蚕抗菌肽表达的功能研究”项目合同书 50
2. 主参
 - 2.1. “绿僵菌素 A 对烟粉虱与家蚕的比较毒理研究”国家自然科学基金委员会资助项目计划书 63
 - 2.2. “蜕皮激素调控去乙酰酶 Rpd3 参与细胞自噬的分子机制”国家自然科学基金委员会资助项目计划书..... 83
 - 2.3. “BmNPV 通过病毒蛋白结合 ATG8 与细胞自噬发生互作的研究”项目任务书 94
 - 2.4. “桔类等绿色智慧种养提质增效技术示范与推广”下达

通知	106
----------	-----

三、论文、著作等

1. 检索证明

1. 1. 以第一作者发表本专业论文检索证明.....	113
-----------------------------	-----

1. 2. 以通讯作者发表本专业论文检索证明.....	115
-----------------------------	-----

2. 以第一作者发表本专业论文情况

2. 1. BmCalpains are involved in autophagy and apoptosis during metamorphosis and after starvation in <i>Bombyx mori</i> .	117
--	-----

3. 以通讯作者发表本专业论文情况

3. 1. Clathrin-dependent endocytosis predominantly mediates protein absorption by fat body from the hemolymph in <i>Bombyx mori</i>	130
---	-----

四、科研成果

1. 科技奖励证书	145
-----------------	-----

五、其他业绩

1. 指导学生学科竞赛

1. 1. 第三届“陌桑杯”全国大学生蚕桑生物技术创新大赛本科生组二等奖“BmCalpainA4的克隆表达及活性鉴定”	147
---	-----

1. 2. 第二届“东方紫杯”全国大学生蚕桑生物技术创新大赛本科生组二等奖“桑树对罗非鱼养殖水体的净化研究” .	149
--	-----

2. 个人荣誉

2. 1. 院级“优秀共产党员”证书	151
--------------------------	-----

2. 2. 院级 2021 年度“优秀班主任”证书	153
---------------------------------	-----

2. 3. 院级 2020 年度“优秀班主任”证书	155
---------------------------------	-----

一、教学研究业绩

1. 教改论文：浅谈蚕桑生物技术课程教学

SCAU LIB202405610

检索证明

根据委托人提供的论文材料，委托人华南农业大学动物科学学院 易辉玉 1 篇论文收录情况如下表。

序号	论文名称	发表刊物及发表的年月卷期/页码等	作者排名	论文等级	作者文中单位	收录情况	影响因子	中科院大分类区
1	浅谈蚕桑生物技术课程教学	广东蚕业 出版年：2019 卷期：53 12 页码：9-10 文献号： 文献类型：	1	普刊类	华南农业大学 动物科学学院	CNKI	无	无

说明：论文等级和中科院大分类分区按《华南农业大学学术论文评价方案（试行）》划分。

报告免责声明：如未盖章，报告无效



ISSN 2095-1205

CN 44-1319/ S

广东蚕业

GUANGDONG CANYE

第 12 期

第53卷2019年



ISSN 2095-1205



12

主办单位：广东省蚕学会

广东丝源集团有限公司

主管单位：广东省丝绸纺织集团有限公司

中国期刊全文数据库 (CNKI) 收录期刊
中国核心期刊遴选数据库收录期刊
中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊
教育阅读网、博看网全文收录期刊
超星期刊域出版平台全文收录期刊

《广东蚕业》编辑委员会 (按姓氏笔画顺序)

主 任 李惠华
副 主 任 林健荣 罗国庆 黄星光
委 员 李惠华 刘新国 刘吉平
孙京臣 邱国祥 吴福泉
吴娱明 林健荣 罗国庆
胡智明 姚锡镇 黄星光
曹 阳 谢汝校

主 编 孙京臣
副 主 编 邱国祥
责 任 编 辑 王先燕 杨 琼 林忠芬

主 办 单 位 广东省蚕学会
广东丝源集团有限公司
主 管 单 位 广东省丝绸纺织集团有限公司
编 辑 出 版 广东蚕业杂志社有限公司
地 址 广州市天河区科华街 73 号
邮 政 编 码 510640
电 话 020-87548949
传 真 020-87569887
E-mail: gdcybjbe@163.com
印 刷 单 位 广州市天河彩佳印刷厂

国内统一连
CN 44-1319/S
续出版物号
国际标准连
ISSN 2095-1205
续出版物号



国内定价 10.00 元
出版日期 2019 年 12 月

目 次

· 蚕业专栏 ·

- 广西养蚕生产经济收益主要影响因素分析 蒋玉莲 (1)
当前桑蚕养殖存在的问题及改进对策 黄瑾琛 (4)
粤椹大 10 在广西平果县栽培模式及效益分析 文柳璿等 (5)
蚕种即浸后冷藏超期限饲养效果分析 刘 蔚等 (7)
浅谈蚕桑生物技术课程教学 易辉玉等 (9)

· 农林环境 ·

- 浅析我国渔业发展战略研究现状 石胜男 (11)
浅谈如东县渔业发展现状与对策 顾倩雯 (13)
小型家庭果园发展智慧农业的可行性探究 陈业欣等 (14)
水稻孕穗期耐冷研究展望 李 娜等 (16)
定边县红梅杏产业发展探索 王 卿 (18)
有机茶叶优质高效栽培技术探讨 杨红艳 (19)
甘孜州地区脆红李栽培技术探讨 隋 明 (21)
油茶种植技术与发展前景分析 苏向明 (22)
化肥减施、有机肥配施对辣椒产量及品质的影响
..... 王建荣 (24)
果树栽培技术提高果实品质的作用探究 王 森 (26)
强化林木育种支撑林业工程建设 盘思军 (27)
提高林业树木种植成活率的技术运用 何 圆 (29)
利用正交设计研究桦树泪的最佳食用方法 葛佳茗等 (30)
林业营造林质量的影响因素及对策探讨 陈 杨 (32)
杨树病虫害防治技术 柴玉梅 (33)
浅析我国农业环境保护的现状 & 问题 张瑞雪 (35)
探讨畜牧养殖中的环境保护问题 余 波等 (36)

· 技术应用 ·

- 数学在农业科学中的应用 杨静雅等 (38)
现代生物技术在农业中的应用 苏 发 (39)
生物类黄酮——花青素合成与转录因子的关系 李瑾瑜 (41)
乙二胺四乙酸二钠在食品检测中研究新进展 孟令丽 (43)
银杏叶中总黄酮的提取 杨 洋等 (44)
食品安全检测技术在初级农产品质量监督中的实践
..... 高 鹏 (46)
苯甲酸钠在食品检测中研究进展 马腾达等 (48)
无糖及低糖奶茶制品成分的系统探究 巫明蓉 (49)
智能机器人在农业自动化领域应用分析 吕颖利 (51)
基于遗传算法的农业机器人路径规划仿真分析
..... 董诗绘 (53)
基于大数据技术 BI 仓储系统平台建设 李瑞吉 (55)

人工智能生活中物联网的应用	赵梵喆等 (56)
蓝牙存储器在农业应用设计中的运用	陈 义等 (58)
室外气象电子设备防雷保护要点	李新豫等 (59)
石墨烯聚丙烯纳米复合材料性能的探究	翁杨琳 (61)
传统元素在现代建筑装饰设计中的应用	朱宇彤 (62)
浅谈传统纹样在现代家具中的应用	王瑞章 (64)

· 经济视野 ·

农村电商向跨境电商转型的途径	徐 军 (65)
“互联网+”推动农业经济发展战略探究	邵海威 (67)
浅谈农业经济管理现状及创新	梁新敏 (69)
新常态下扩大旅游消费的对策	欧 荪 (71)
中俄远东合作给东北振兴带来的机遇和挑战	张淑芳 (72)
嘉兴丝绸企业 OFDI 现状初探	
——基于重点企业调研数据的分析	王语彤等 (74)
浅谈中国体育用品制造业的转型升级	刘志勇等 (76)

· 旅游与文化 ·

乡村旅游新业态主体培训现状探究	
——以泰州市农村旅游从业人员为例	申 倩 (78)
基于地理位置影响的山西非物质文化遗产旅游发展研究	史永菲 (80)
全域旅游视角下涠洲岛旅游发展探究	马湫翔 (81)
大数据在旅游管理中的应用与实践	王 艺 (83)
人工导游的优势及发展建议	唐若璘 (84)
涉外旅游酒店餐饮管理实践教学三维结构探究	李朝洲 (86)
基于就业形势谈空中乘务服务	张潇潇 (87)
四平地区民俗艺术产业链发展建设探究	刘丹丹 (89)
“信息技术+”背景下少数民族手工艺传承模式探究	陈昭昭等 (91)
探讨传统文化在现代环境设计中的应用	陈勃宇 (92)
浅谈侗戏的新媒体传播策略	肖 锋等 (94)

· 教育文化 ·

农村健康教育教学干预实践探究	郭立秋 (95)
食品科学与工程专业《食品化学》教学改革创新探讨	刘义庆 (97)
浅谈高职《咖啡西点制作》课程专创融合	王金凤 (98)
信息化环境下教师教学能力探究	吴金秀 (100)
加快高职优质教育资源共享的实施路径	解 为 (101)
高职计算机专业的职业技能培养模式探究	周友碧 (103)
基于网络环境下大学英语学习的探讨	林承香 (105)
“产出导向法”在财务专业高职大学英语教学中的应用	张彦玲 (106)

浅谈知识结构视野下的外语教师专业发展	
——以成都两所高校为例	李 懿 (108)
翻转课堂在《英语国家概况》教学中的应用	赵 莲 (110)
高职语文教育对提升新农村文化建设的建议	冯妮妮 (112)
农村小学语文课堂书法教学策略	李 林 (113)
浅谈高职院校校园足球氛围现状调查	
——以青岛酒店管理职业技术学院为例	薛 斌 (115)
浅谈高职院校酒店管理专业学生体育艺术素养的培养	庞雅静 (116)
农村幼儿园亲子音乐游戏活动指导策略	秦 露 (118)
校园足球推广发展的困境及对策	张志坚 (119)
浅谈高等教育下雨课堂的教学应用	韩文俊等 (121)
应用型本科《PLC》课程在慕课环境下教学模式探究	贾冬义 (122)
浅谈预科本科生学习适应性问题及对策	
——基于江西科技学院的调查	王七苟 (124)
三位一体的育人机制与三全育人模式的互融性探究	李洪波 (126)
奥尔夫教学法在农村音乐学前教育中的应用	石 爽 (128)
大师工作室与光伏发电技术与应用专业课程实践教学有机结合策略	王 宏 (129)
仿真技术在机械专业实验教学中的运用	卜 雷 (131)
浅谈新疆高校智能制造工程专业建设	葛露娟等 (133)
男装产品款式研发初探	
——以校企合作项目为例	郑子敏等 (134)
镂空处理在服装设计中的运用	殷 侃等 (136)
基于网络空间的高职创业法律教育路径创新	王 芳 (138)
提升高职学生就业能力的策略	朱 钰 (139)
浅谈本科高校“学科-专业”一体化建设	张 丽等 (141)
四维主体视域下应用型本科院校教师绩效评价体系构建	
——以 X 学院为例	文 琼 (143)
高校如何利用在线协同办公软件提高工作效率	保 阳 (145)
基于大数据“MOOC”课程优化策略	冯芝丽 (147)

· 乡村发展 ·

乡村旅游扶贫的实施策略	田 超 (149)
浅析乡村旅游视域下“农家乐”建筑环境营造	刘建村 (150)
新型农村农民医疗现状分析	郭立秋 (152)
衡水地区农村图书馆发展现状及规划建议	严 飞 (153)
浅析信息化背景下农业档案管理路径	白茹玉 (155)
《广东蚕业》编辑部有关版权声明	(156)

浅谈蚕桑生物技术课程教学

易辉玉 黄志君

(华南农业大学动物科学学院 广东广州 510642)

摘 要 蚕桑生物技术是推动蚕桑科学和蚕桑产业创新与发展的源泉,是新时代蚕桑高水平专业人才必须掌握的知识和技术。文章由系统开设蚕桑生物技术课程的必要性出发,基于目前该课程的开设现状,对教学内容、教学方法和教学实践三方面提出了建议。

关键词 蚕桑生物技术;课程教学;建议

中图分类号:G634.91

文献标识码:A

文章编号:2095-1205(2019)12-09-02

生物技术(Biotechnology)是指以生物科学为基础,结合化学、工程等学科知识和技术,利用生物体或其组成部分生产有价值的物质或为人类提供服务的技术。近几十年来,生物技术迅速发展,已成为当今科学技术发展中的佼佼者。生物技术融合于农学、生物科学、信息、化学、工程等众多学科和专业,不仅推动了各学科、专业的革新与持续发展,也带动和促进了它们在农业、医学、环境、工程各领域中的实践与应用。

蚕学专业是我国的一个传统专业。正是因为一大批优秀的蚕桑科学家和工作者坚持以科技为先导,结合先进的生物科学理论和生物技术发展和壮大蚕桑科学和产业,蚕学专业才能不断发展至今。对蚕学专业学生开设蚕桑生物技术课程是时代所需,也是蚕学专业持续发展所需。本文从开设蚕桑生物技术课程的必要性和现状出发,提出了蚕桑生物技术课程教学的几点建议。

1 开设蚕桑生物技术课程的必要性

近50年来,随着新型生物技术的不断出现,我国的蚕桑生物技术发展非常迅速,在家蚕基因组、家蚕变态发育调控、家蚕性别控制、蚕丝蛋白生物材料、转基因家蚕、家蚕生物反应器、桑树基因组、桑树栽培及遗传育种以及蚕桑资源综合利用等方面都取得了很多的成果和进步,极大地促进了蚕桑科学和蚕桑产业的发展。蚕桑生物技术是蚕学、桑树学与生物技术融合的产物,是蚕桑科学家和工作者智慧的结晶,是蚕桑科学现代化的标志,也是现代蚕桑产业发展的源泉。蚕桑生物技术的发展即代表着蚕桑科学和蚕桑产业的发展。现代蚕桑产业不再是传统意义上的种桑养蚕、缫丝织绸,而是与21世纪的朝阳——生物技术紧密接轨,在农、林、牧、食品、医药、生态、文明等众多行业和领域都有广阔前景的潜力产业,需要的是了解和掌握现代生物技术,具有扎实专业知识和较强实践能力的高水平复合型专业人才。

2015年,“创新创业”上升为国家战略,国家、高校和企业开始大力推行创新创业教育和实践。2018年,第一届全国大学生蚕桑生物技术创新大赛在江苏科技大学成功举办,第二届即将在西南大学举行。因此,开设蚕桑生物技术课程既是蚕桑专业人才培养的需要,也是新时代蚕桑科

学和产业发展的需要。蚕桑生物技术课程以让学生系统学习和掌握现代蚕桑生物技术为目的,不但可以让学生切身地、系统地了解蚕桑科学和蚕桑产业的发展现状和前景,激发兴趣,树立信心,还可以让学生动手体会并深化蚕桑科学知识,培养和启迪学生的多向思维,诱导学生思考自己想要做的事情,学会规划和完成目标。

2 蚕桑生物技术课程开设现状

目前,多数学校都没有专门或系统开设蚕桑生物技术课程,而是把蚕桑生物技术内容放入《遗传学》《基因工程》《细胞生物学》《家蚕遗传育种》《茧丝学》以及《蚕业资源综合利用》等相关理论或实验课程中进行讲授或实践操作。这些课程都是蚕桑生物技术的基础,但它们本身自成体系,内容较多,可分配讲授蚕桑生物技术的时间有限;蚕桑生物技术相关内容常被作为相关原理或方法的实例进行介绍,不能独立成章节,不容易引起学生重视。而且,蚕桑生物技术是学科的交叉和融合,一项技术包含多门课程知识,如家蚕杆状病毒表达系统涉及了家蚕、病毒、细胞、遗传重组、基因工程等相关知识和技术;不同的课程侧重点各有偏差,不利于学生进行系统理解和记忆,还容易使学生混淆而找不准重点。另外,虽然蚕桑生物技术的根本是基因工程、细胞工程以及生化工程等相关技术,但实验步骤、方法与它们并不完全相同;且蚕桑生物技术的完整实验步骤相对较多,按基因工程实验、细胞工程实验或生化工程实验等分开进行,难以系统地进行实验操作,学生掌握程度有限。

近年来,随着教学改革的深入,有学校已开设了蚕桑生物技术相关课程。如山东农业大学开设了《蚕桑生物技术及新产品开发》的专业选修课,主要以理论讲授为主,课时36学时,其中理论27学时,实验9学时,实验课时相对偏少。我们学校开设了《蚕桑生物技术综合实验》课程,但实验内容主要以基本的基因工程实验为主,如家蚕组织RNA的提取、目的基因的克隆表达以及蛋白质纯化等。受实验经费、条件、时间等限制,常只是选做蚕桑生物技术中的一部分实验,也无法开设像家蚕转基因等设备要求相对较高的实验。

3 蚕桑生物技术课程教学的建议

3.1 课程内容紧跟发展前沿

蚕桑生物技术课程的教学内容可以参考浙江大学鲁兴萌教授主编的《蚕桑高新技术研究与进展》(中国农业大学出版社2012年2月第一版)一书。本书由浙江大学和苏州大学多位一直致力蚕桑教学和科研并在相关领域取得很多成果的教授编写,涵盖桑树生物工程、家蚕生物工程和蚕桑资源利用的高新技术,共分为8章。第1章为桑树生物工程,包括桑树组织培养、桑树转基因和DNA分子标记等技术;第2~7章为家蚕生物工程,包括家蚕转基因技术、营养与人工饲料育、激素与生长发育调控、防御与养蚕用药物、病害诊断与检测技术以及杆状病毒表达系统与重组蛋白生产技术6个内容;第8章为蚕桑资源利用技术,包括蚕沙、蚕蛹、蚕类抗菌肽、蚕丝蛋白以及桑树等相关资源的利用技术。

生物技术发展很快,每年都有新的技术和成果产生。上课老师应及时关注最新发展动态,将生物技术和蚕桑生物技术的最新成果引入教学,如CRISPR/Cas9转基因技术在家蚕上的应用、家蚕杆状病毒表达系统和家蚕丝腺生物反应器的技术更新和最新成果以及家蚕人工饲料养蚕的新动态等。课程内容紧跟发展前沿,既能丰富教学内容,使学生了解和掌握最新发展动态,也能引发学生的兴趣,培养和提高他们的科学思维能力。

3.2 灵活运用研讨式教学

生物技术的步骤和方法比较枯燥,不能按常规方式直接讲授。上课老师应积极引导进行主动学习,多开展互动式、研讨式教学。通过提问、预习等方式首先让学生思考该项生物技术可否、如何用于家蚕或桑树,然后带领学生一起进行可行性分析和具体方法步骤的学习。“无研讨,不大学”,研讨式教学已成为高校一种主要的教学方法。在蚕桑生物技术课程中,多项技术的方法和用途都可以专题讨论的方式进行教学:引导学生查阅文献资料进行自主学习和思考,然后通过小组合作、PPT汇报等形式进行讨论和总结。另外,还可通过研讨式教学启迪学生去思维,去创新。比如在讲授桑树生物工程时,启迪学生自我思考:为什么桑树生物工程技术发展缓慢?在现代立桑为业的发展下,桑树产业需要哪些技术?如何去实现?在课程结束时,让学生对蚕桑产业现状和问题进行分析,并针对问题提出应对策略。这种通过自主学习和讨论讲解的教学方式,可以充分发挥学生的自主能动性,让学生不仅掌握知识,还能掌握学习方法。而且,学生在思考和解决问题的同时,兴趣和信心被激发,创造力也可得到锻炼和提升,这正是当代素质教育的目标。

3.3 理论与实践结合

高等教育改革的一个重要内容就是加强实验实践教学,这是培养创新人才的重要途径。理论教学是基础,实践教学是理论教学的延伸和补充,二者相互融合,既可以

加深理解,又可以培养和锻炼实践能力。

蚕桑生物技术相关内容较多,光理论讲授技术和应用,学生难以理解和记忆;如果能让学生自己动手进行操作,在加强记忆的同时可激发兴趣并产生成就感。笔者在授课时发现,学生们对家蚕杆状病毒表达系统在药物筛选、疫苗开发和基因治疗等领域的应用很感兴趣,非常好奇家蚕杆状病毒被用于疫苗的过程;另外,当讲到发荧光的家蚕和荧光蚕丝时,学生们也是很想一睹为快。因此,如果能同时开设实验或实践课程,让学生动手操作一次,学生在满足了好奇心的同时,既能掌握技术,又能体会蚕桑生物技术的力量和用途,更能发挥主观能动性,积极进行思考和创新。同时,因为蚕桑生物技术涉及的理论基础较多,单单只进行实验或实践课程,学生难以完全理解其中的原理。因此,蚕桑生物技术课程需要理论讲授与实践操作有机结合。

4 小结

生物技术是现代产业创新和发展的源泉。现代蚕桑产业需要熟练掌握传统和现代蚕桑技术的创新型人才。因此,在蚕学专业人才培养体系中,有必要系统开设蚕桑生物技术课程。课程教学上,灵活运用研讨式的教学方式,将理论教学和实践教学有机融合,激发学生的兴趣,培养学生独立思考 and 创新能力,让学生通过对蚕桑高新知识和技术的学习,树立发展蚕桑科学和产业的信心。

参考文献

- [1]鲁兴萌.蚕桑高新技术研究与进展[M].中国农业大学出版社,2012.
- [2]刘限,夏润玺,杨瑞生,等.高等农业院校蚕学专业建设和教学改革思考[J].沈阳农业大学学报,2017,19(6):695-699.
- [3]黎月娟,邱长玉,林强,等.“一带一路”背景下高等院校蚕学专业教育现状的思考与对策的研究[J].广西蚕业,2018,55(3):43-47.
- [4]牛晓妍,董欲超,张荷立,等.大学生创新型人才培养研究[J].教育教学论坛,2019(29):53-54.

广东蚕业

GUANGDONG CANYE

月刊

1959年1月创刊

第53卷

2019年第12期

出版日期：2019年12月

主编：孙京臣

副主编：邱国祥

责任编辑：王先燕 杨琼 林忠芬

印刷：广州市天河彩佳印刷厂

发行范围：国内外公开发行

主办单位：广东省蚕学会

广东丝源集团有限公司

主管单位：广东省丝绸纺织集团有限公司

编辑出版：广东蚕业杂志社有限公司

通讯地址：广州市天河区科华街73号

邮政编码：510640

联系电话：020-87548949

E-mail：gdcybjbe@163.com

广东蚕业

第五十三卷

第十二期

二〇一九年十二月



刊号：ISSN 2095-1205
CN 44-1319/ S

本期责任编辑：王先燕

封面设计：三生

国内定价：10.00元

一、教学研究业绩

2. 教学成果佐证材料

2.1 主持：校级一流课程《桑树学》



校内通知

所有通知

机关部处

教学单位

教辅/科研单位

群团/附属单位

关于2024年度校级一流课程（金课）拟认定名单的公示

来源单位及审核人： 编辑： 审核发布：本科生院（招生办公室） 发布时间：2024-04-30

各学院（部）、各相关单位：

根据《关于开展2024年度校级一流课程（金课）遴选认定工作的通知》精神，本科生院组织开展了2024年校级一流本科课程申报和遴选工作。经本人申报、所在单位审核、公示并推荐、学校组织专家评审等程序，遴选出我校一流本科课程49门（包含线下一流课程37门、线上线下混合式一流课程12门）。现将遴选结果予以公示，详细名单见附件。

公示时间为2024年4月30日至2024年5月6日，共7天。在公示期内如有异议，请在5月6日17:30前邮件或直接送本科生院教研科（行政楼329），反馈情况时要签署真实姓名，要有具体事实依据，否则不予受理。

联系人：孙航

联系电话：85280052

邮箱：gjyj@scau.edu.cn

本科生院（招生办公室）

2024年4月30日

2024年度校级一流课程（金课）拟认定名单

序号	课程名称	课程类别	所属单位	课程负责人	课程团队其他主要成员
1	材料科学基础II	线下一流课程	材料与能源学院	刘维	胡航、梁业如、董 汉武、刘彦祺
2	区域规划	线上线下混合式一流课程	公共管理学院	李玮	吴顺辉、孙传淳、王玉琳、刘 卓君
3	数值分析	线下一流课程	数学与信息学院	李娇娇	张昕、赵峰、梁艳影、何艳玲
4	数学I	线下一流课程	数学与信息学院	周裕中	湛秋辉、张昕、尤雪莲、曾庆 茂
5	基础化学实验II	线上线下混合式一流课程	材料与能源学院	肖勇	刘海峰、林碧敏、 张浩然、周晓华
6	园艺植物育种学	线下一流课程	园艺学院	胡桂兵	曹必好、杨向晖、陈长明、赵 杰堂



					鹤森
11	高等数学BI（经管类）	线下一流课程	数学与信息学院	江雪萍	林利云、尤雪莲、王雪琴、周裕中
12	电视摄像	线上线下混合式一流课程	艺术学院	李俊良	赵娜、胡年春、王新锋、李凡
13	信息光学	线下一流课程	电子工程学院（人工智能学院）	翁嘉文	李海、杨初平、潘哲明、曾应新
14	《视听语言》	线下一流课程	艺术学院	王柯	苏珊珊、辛珏、涂先智、冯逸章
15	物理化学	线下一流课程	材料与能源学院	陈明洁	方岳平、胡航，刘维、杨思源
16	公益慈善学概论	线下一流课程	公共管理学院	廖慧卿	曾永辉、唐晓容
17	自动控制原理I	线下一流课程	工程学院	邢航	李继宇、杨秀丽、漆海霞、金济
18	公共管理心理学	线上线下混合式一流课程	公共管理学院	贾海薇	张雯闻、邓永超、刘辉、贾昕珊
19	钢琴	线下一流课程	艺术学院	朱虹	叶妮、佟羽佳、黄越嘉、栾志弘
20	模拟电子技术	线下一流课程	电子工程学院（人工智能学院）	殷惠莉	宋淑然、薛秀云、史艳玲、梁娟
21	动物营养学	线下一流课程	动物科学学院	谭成全	江青艳，任文凯，习欠云，邓近平
22	农业植物病理学	线下一流课程	植物保护学院	许美容	张彤、邓晓玲、郑正、徐春玲
23	桑树学	线下一流课程	动物科学学院	易辉玉	刘吉平，刘伟强，黄志君，田铃
24	林木育种学	线上线下混合式一流课程	林学与风景园林学院	周玮	陈晓阳、骈瑞琪、张俊杰
25	茶叶加工学	线下一流课程	园艺学院	张凌云	马红彦、陈文品、刘少群
26	普通植物病理学	线下一流课程	林学与风景园林学院	单体江	毛子翎、李敏慧、徐春玲、吴奉奇
27	金融计量学	线下一流课程	经济管理学院	蔡键	王雄志、周丽云、谭莹、苏柳方
28	森林培育学	线下一流课程	林学与风景园林学院	邱权	何茜、刘效东、陈祖静、潘澜
29	抽样调查	线下一流课程	数学与信息学院	杨志程	肖莉、周燕、丁仕虹
30	世界古代史1	线下一流课程	人文与法学学院	邵兆颖	殷小平、何艳玲
31	农产品安全检测	线上线下混合式一流课程	植物保护学院	钟国华	刘婕，徐振林，伍欣宙，赵晨
32	中外服装史	线下一流课程	艺术学院	黄听雨	唐土红、郑琳喆
33	公共财政与公共预算	线上线下混合式一流课程	公共管理学院	武玉坤	段静、吴彦
34	建成环境规划与设计IV	线下一流课程	林学与风景园林学院	陈崇贤	陈绍涛
35	遗传学	线下一流课程	动物科学学院	邓小娟	杨婉莹，易辉玉，刘伟强



40	劳动经济学	线下一流课程	公共管理学院	陈然	刘娟、杨明旭、徐强、徐涵涛
41	英语文学导论	线上线下混合式一流课程	外国语学院	张丁元	侯金萍, 朱婕, 王之杰, 谢治萍
42	单片机原理与应用	线上线下混合式一流课程	工程学院	徐兴	莫嘉嗣
43	画法几何与机械制图 II	线下一流课程	工程学院	罗菊川	文晟、张增学、袁群莉
44	水利工程施工	线下一流课程	水利与土木工程学院	余长洪	周浩澜、杨海燕、刘远
45	食品分析	线上线下混合式一流课程	食品学院	温棚	徐振林, 沈玉栋, 徐小艳, 罗林
46	兽医寄生虫学	线上线下混合式一流课程	兽医学院	郭亚琼	元冬娟、夏宁波、李娜、冯耀宇
47	西方文明史	线下一流课程	外国语学院	朱婕	侯金萍 张丁元
48	工程力学	线下一流课程	水利与土木工程学院	卢玉华	胡圣荣 许静静 刘新红
49	常微分方程	线下一流课程	数学与信息学院	王霞	邱华、危苏婷、谢常平

分享至:

联系我们 地址: 广州市天河区五山华南农业大学 邮编: 510642 管理

SCAU Copyright © 2024华南农业大学 All rights reserved备案编号: 粤ICP备05008874号 440101

一、教学研究业绩

2. 教学成果佐证材料

2.2 参加（排名 5）：省级一流课程《蚕业资源综合利用》

广东省教育厅

粤教高函〔2023〕33号

广东省教育厅关于公布 2023 年度省级一流 本科课程认定结果的通知

各本科高校：

根据《广东省教育厅关于开展 2023 年度省一流本科课程遴选认定工作的通知》，经学校推荐、专家评审、公示、复审等环节，认定中山大学《收益管理》等 950 门课程为 2023 年度省一流本科课程。其中，线上一流课程 66 门，线下一流课程 349 门，线上线下混合式一流课程 491 门，社会实践一流课程 44 门，现予以公布（详见附件）。

各高校要高度重视一流课程建设，积极为认定课程的持续更新完善及教学应用提供资金及政策支持，充分发挥认定课程在教学改革中的示范作用，引导教师全员更新课程建设理念、创新课程教学方法、完善过程考核评价，全面提升课程质量。

以上认定课程应至少持续提供教学服务至 2028 年，期间课程负责人、教学团队、排课情况应保持基本稳定。线上一流课程须同时在粤港澳大湾区高校在线开放课程联盟平台开放共

享。相关课程平台应做好课程的运营、服务、及网络安全保障工作，保障课程稳定运行。

省教育厅优先支持上述认定课程申报国家级一流本科课程，并通过评价调研、定期检查等方式，对认定课程的后续建设工作进行跟踪监管。未能按照一流课程要求应用、完善或共享的课程，将取消省一流课程资格。

附件：广东省 2023 年度省级一流本科课程名单



附件

广东省 2023 年度省级一流本科课程名单

一、线上一流课程

学校	课程名称	负责人
中山大学	收益管理	曾国军
中山大学	基础心电图诊断与应用	柳俊
华南理工大学	健康塑身普拉提	郑戴娜
华南理工大学	多媒体技术及应用	郭芬
华南理工大学	咖啡学概论	庄军平
暨南大学	数据可视化——基于 Python 的应用	王斌会
暨南大学	金融风险管理：量化投资视角	陈创练
暨南大学	中级财务会计	齐珺
暨南大学	Intercultural Communication 跨文化传播	林仲轩
暨南大学	药事管理与法规	宿凌
暨南大学	中医与辨证	薛飞飞
暨南大学	基础日语	欧阳丹
暨南大学	文化翻译入门	陈毅平
暨南大学	中国税法：案例·原理·方法	方赛迎
华南农业大学	观赏鱼饲养	赵会宏
华南农业大学	大学英语写作	杨曙
南方医科大学	肿瘤放射治疗学	丁轶
南方医科大学	实用医学英语	龙艳霞
广州中医药大学	岭南针灸流派——靳三针疗法	王澍欣
广州中医药大学	康复评定学	谢芹
广州中医药大学	中西医结合耳鼻喉科学	陈文勇

三、线下一流课程

学校	课程名称	负责人
中山大学	护理管理学	张俊娥
中山大学	临床解剖学	汪华侨
中山大学	地球化学	张玉芝
中山大学	太阳系之旅	王爽
中山大学	结构化学	潘梅
中山大学	海洋微生物学	贾坤同
中山大学	幸福心理学	高定国
中山大学	药理学	刘培庆
中山大学	财务报表分析与证券估值	曹春方
中山大学	公共政策导论	朱亚鹏
中山大学	虚拟与增强现实	金枝
中山大学	生态学	汤叶涛
中山大学	土木、水利与海洋工程概论	林凯荣
中山大学	临床医学导论	张昆松
中山大学	运作管理	陈志祥
中山大学	社会政策导论	岳经纶
华南理工大学	人工智能与 3D 视觉	徐雪妙
华南理工大学	数据挖掘	蔡毅
华南理工大学	电磁场与电磁波	涂治红
华南理工大学	数据结构与算法	陈百基
华南理工大学	工程导论实践 I	舒琳
华南理工大学	城乡规划设计（二、三）	王世福
华南理工大学	电力系统稳定性	张俊勃
华南理工大学	互换性与技术测量	李旻

学校	课程名称	负责人
暨南大学	网络传播概论	罗昕
暨南大学	统计学原理	伍业锋
暨南大学	国际企业管理	杨学军
暨南大学	媒介经营管理	陈致中
暨南大学	公共政策学	郑石明
暨南大学	营销模拟与诊断	周宏
暨南大学	政治学	胡涤非
暨南大学	人机交互（全英）	龙锦益
华南农业大学	管理研究方法	方敏
华南农业大学	中级财务会计 I	陈晓敏
华南农业大学	公共部门人力资源管理	杨正喜
华南农业大学	农村社会工作	李锦顺
华南农业大学	习近平新时代中国特色社会主义思想概论	陈洁
华南农业大学	数字电路与逻辑设计	黄琼
华南农业大学	数字电子技术	赵文锋
华南农业大学	马克思主义基本原理	程华
华南农业大学	家居新材料	孙理超
华南农业大学	发电厂电气部分	孙振刚
华南农业大学	动物营养学	张世海
华南农业大学	材料物理	雷炳富
华南农业大学	蚕业资源综合利用	陈芳艳
华南农业大学	大学数学 II	肖莉
华南农业大学	普通生态学	舒迎花
华南农业大学	植物学	白玫
华南农业大学	有机化学	李春远
华南农业大学	概率论与数理统计	李朗

一、教学研究业绩

3. 编写教材

3.1 副主编：《蚕桑生物技术实验指南》

CANSANG SHENGWU JISHU SHIYAN ZHINAN



蚕桑生物技术 实验指南

主 编 杨婉莹
副主编 易辉玉

天津出版传媒集团



天津科学技术出版社

图书在版编目（C I P）数据

蚕桑生物技术实验指导 / 杨婉莹主编. -- 天津：
天津科学技术出版社, 2021.8

ISBN 978-7-5576-9613-9

I. ①蚕… II. ①杨… III. ①家蚕－病原微生物－实
验 IV. ①S881.2-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2021)第157893号

蚕桑生物技术实验指导

CANSANG SHENGWU JISHU SHIYAN ZHIDAO

责任编辑：李 彬

责任印制：兰 毅

出 版： 天津出版传媒集团
天津科学技术出版社

地 址：天津市西康路35号

邮 编：300051

电 话：(022)23332377（编辑部）

网 址：www.tjkjcs.com.cn

发 行：新华书店经销

印 刷：潍坊彩峰印务有限公司

开本 787×1092 1/16 印张 9 字数 202 000

2021年8月第1版第1次印刷

定价：32.00 元

目录

第一篇 基因工程原理	1
概论	1
第1章 目的基因的分离	2
第2章 基因工程载体	4
第1节 载体的功能和应具备的特点	5
第2节 几种载体的特性	6
第3节 基因工程中常用载体	9
第3章 限制性内切核酸酶	21
第1节 限制性内切核酸酶的特征	21
第2节 基因工程中常用的限制性内切核酸酶	23
第3节 影响酶切活性的主要因素	25
第4章 重组载体的构建	28
第1节 DNA连接酶	28
第2节 DNA重组连接方式	29
第3节 影响DNA连接反应的因素	32
第5章 重组载体转化宿主细胞	34
第1节 受体细胞的选择	34
第2节 转化方法	38
第6章 重组体阳性克隆的筛选	41
第1节 重组体的遗传学筛选法	41
第2节 物理检测法	42
第3节 分子生物学检测法	42
第7章 外源基因表达及表达产物的检测	46
第1节 IPTG诱导大肠杆菌外源基因表达	46
第2节 甲醇诱导酵母菌外源基因表达	48

第3节 表达蛋白的分离纯化	48
第8章 电泳	53
第1节 琼脂糖凝胶电泳	53
第2节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	54
第二篇 蚕桑基因工程常用技术	56
第1章 核酸的抽提	56
实验1 家蚕卵DNA的抽提	57
实验2 桑树全基因组DNA的抽提	58
实验3 黑胸败血芽孢杆菌基因组DNA的抽提	59
实验4 家蚕多角体病毒BmNPV病毒DNA的抽提	60
实验5 pET-21d质粒的抽提	61
实验6 家蚕脂肪体RNA的抽提	63
第2章 核酸的定量及电泳检测	65
实验1 琼脂糖凝胶电泳	65
实验2 DNA和RNA的定量分析	66
第3章 PCR基因扩增	68
实验1 SUMO-hydralysin-2的PCR基因扩增	68
实验2 RT-PCR	71
实验3 荧光定量PCR检测	73
第4章 重组载体的构建	76
实验1 SUMO-hydralysin-2扩增片段的回收纯化	76
实验2 SUMO-hydralysin-2和载体的酶切酶连	77
第5章 重组子的转化与筛选	79
实验1 大肠杆菌感受态的制备	79
实验2 重组质粒转化感受态细胞	81
实验3 重组菌的蓝白斑筛选及鉴定	82
第6章 外源基因在宿主细胞中的表达	84
实验1 SUMO-hydralysin-2融合蛋白在大肠杆菌中的表达	84
实验2 在酵母中表达目的蛋白	85

实验3 杆状病毒表达系统在昆虫细胞中表达外源蛋白	87
实验4 在哺乳动物细胞表达外源蛋白—瞬时转染	89
实验5 在哺乳动物细胞表达外源蛋白—稳定表达细胞系的筛选	90
实验6 重组蛋白hydralysin-2的SDS-PAGE电泳	91
实验7 重组蛋白hydralysin-2的Western Blot检测	94
 第7章 表达蛋白的纯化	97
实验1 hydralysin-2蛋白的Ni-NTA亲和层析纯化	97
实验2 目的蛋白的透析复性	99
 第8章 表达蛋白的功能鉴定	101
实验1 蛋白质定量测定	101
实验2 hydralysin-2蛋白的活性检测	104
实验3 凝胶迁移或电泳迁移率实验 (EMSA)	105
实验4 免疫共沉淀 Co-IP	109
 第三篇 实验室安全管理及基本操作	112
第1章 实验室安全管理	112
第1节 实验室安全常识及管理	112
第2节 分子生物学实验室安全	114
第3节 细胞房的安全常识及管理	119
第4节 放射性物质的安全使用和防护	120
 第2章 实验室基本操作	122
第1节 玻璃仪器	122
第2节 分光光度计	123
第3节 干燥箱	124
第4节 培养箱	125
第5节 离心机	127
第6节 酸度 (pH) 计	128
第7节 电泳仪	130
第8节 PCR仪	131
第9节 超声波细胞破碎仪	133
第10节 凝胶成像系统	134
 参考文献	136

蚕桑生物技术实验指南

主 编

杨婉莹

副主编

易辉玉

天津出版传媒集团



天津科学技术出版社



ISBN 978-7-5576-9613-9



9 787557 696139 >

定价：32.00元

一、教学研究业绩

3. 编写教材

3.2 参编：“十三五”规划教材《蚕桑产品深加工技术》



普通高等教育农业农村部“十三五”规划教材
全国高等农林院校“十三五”规划教材

蚕桑产品

深加工技术

桂仲争 陈芳艳◎主编

CANSANG CHANPIN SHENJIAGONG JISHU



首批全国优秀出版社

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

蚕桑产品深加工技术/桂仲争, 陈芳艳主编. —北京: 中国农业出版社, 2021. 7
普通高等教育农业农村部“十三五”规划教材 全国
高等农林院校“十三五”规划教材
ISBN-978-7-109-28548-4

I. ①蚕… II. ①桂… ②陈… III. ①蚕桑生产—高等学校—教材 IV. ①S88

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2021) 第 144029 号

中国农业出版社出版

地址: 北京市朝阳区麦子店街 18 号楼

邮编: 100125

责任编辑: 何 微 文字编辑: 徐志平

版式设计: 王 晨 责任校对: 刘丽香

印刷: 北京印刷一厂

版次: 2021 年 7 月第 1 版

印次: 2021 年 7 月北京第 1 次印刷

发行: 新华书店北京发行所

开本: 787mm×1092mm 1/16

印张: 17.5

字数: 425 千字

定价: 49.50 元

版权所有·侵权必究

凡购买本社图书, 如有印装质量问题, 我社负责调换。

服务电话: 010-59195115 010-59194918

主 编 桂仲争（江苏科技大学）

陈芳艳（华南农业大学）

参 编 江苏科技大学 王 俊 侯成香 张 然 李 豪 辛向东

华南农业大学 易辉玉 严会超

浙江大学 朱祥瑞

云南农业大学 龚元圣

广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所 邹宇晓

四川省农业科学院蚕业研究所 刘 刚 黄盖群

广西壮族自治区蚕业技术推广总站 刘艳伟

安徽农业科学院蚕桑研究所 于 洁

江苏省农业科学院 蒋希芝 吴凤瑶



前言

第一章 蚕桑产品利用的发展历程	1
第一节 蚕桑产品及其开发利用历程	1
第二节 蚕桑产品应用现状与前景	6
第三节 蚕桑产品深加工利用的意义	7
第二章 蚕幼虫深加工	9
第一节 僵蚕	9
第二节 全蚕粉	16
第三章 蚕蛹蛋白质深加工	19
第一节 蚕蛹蛋白质含量及营养价值	19
第二节 蚕蛹蛋白质的提取方法	22
第三节 蚕蛹蛋白质异味成分及脱臭方法	24
第四节 蚕蛹蛋白质活性肽的制备工艺	32
第五节 蚕蛹氨基酸的制备工艺	37
第六节 蚕蛹氨基酸的检验和应用	39
第四章 蚕蛹油脂深加工	41
第一节 蚕蛹脂肪酸的组成与含量	41
第二节 蚕蛹油脂的组成成分	43
第三节 蚕蛹油脂的提取方法	45
第四节 蚕蛹油脂的精炼方法	52
第五节 蚕蛹油脂的应用	56
第五章 蚕蛹甲壳素	59
第一节 甲壳素和壳聚糖的结构特征	59
第二节 甲壳素和壳聚糖的性质	64
第三节 蚕蛹甲壳素的分离	66

第四节	蚕蛹甲壳素和壳聚糖的质量控制	66
第五节	蚕蛹甲壳素的应用	69
第六章	蚕蛹虫草	71
第一节	虫草及其分类	71
第二节	蛹虫草的培育	76
第三节	蚕蛹虫草的组成成分	78
第四节	蛹虫草的药理作用	80
第五节	蛹虫草的开发应用	83
第七章	蚕蛾深加工	85
第一节	蚕蛾的主要成分及营养价值	86
第二节	蚕蛾产品深加工工艺	91
第三节	蚕蛾产品的开发利用	95
第八章	蚕沙产品深加工	97
第一节	蚕沙的基础理化性质	97
第二节	蚕沙枕头的开发	98
第三节	蚕沙有机肥	99
第九章	蚕沙提取物深加工	111
第一节	蚕沙糊状叶绿素的提取工艺	111
第二节	蚕沙提取叶绿素铜（铁）钠盐	115
第三节	蚕沙植物醇及类胡萝卜素的提取工艺	119
第四节	蚕沙果胶的提取工艺	124
第十章	桑叶深加工	127
第一节	桑叶的成分及药用价值	127
第二节	桑叶菜的加工工艺	137
第三节	桑叶茶的加工工艺	139
第四节	桑叶粉的加工工艺	145
第五节	桑叶饲料的加工工艺	146
第十一章	桑椹深加工	153
第一节	桑椹的成分及成熟过程	154
第二节	桑椹汁的加工工艺	156
第三节	桑椹果酒的加工工艺	160
第四节	桑椹果酱的加工工艺	163
第五节	桑椹果醋的加工工艺	164

第六节	桑椹红色素的加工工艺·····	165
第七节	桑椹干的加工工艺·····	168
第八节	桑椹保鲜技术·····	169
第十二章	桑枝深加工 ·····	174
第一节	桑枝的成分·····	174
第二节	桑枝纤维板的加工工艺·····	176
第三节	桑枝纤维纸的加工工艺·····	177
第四节	桑枝黏胶丝的加工工艺·····	180
第五节	桑枝食用菌的栽培·····	183
第十三章	蚕丝蛋白深加工 ·····	191
第一节	蚕丝蛋白的组成及性质·····	191
第二节	再生丝素蛋白的制备·····	199
第三节	蚕丝蛋白利用新途径·····	202
第四节	绢纺厂、丝绵厂丝胶废水的处理·····	218
第十四章	蚕丝被加工 ·····	221
第一节	蚕丝原料和蚕丝绵分类·····	221
第二节	蚕丝绵的加工工艺·····	224
第三节	蚕丝被的加工工艺·····	229
第十五章	蚕生物反应器 ·····	234
第一节	昆虫杆状病毒表达系统·····	235
第二节	家蚕 BmNPV 生物反应器 ·····	241
第三节	家蚕丝腺生物反应器·····	246
第四节	家蚕生物反应器的应用前景·····	250
第十六章	桑树的生态修复与保护 ·····	252
第一节	水土保持与防护林构建·····	252
第二节	城市绿化带修建·····	253
第三节	消落带生态修复·····	254
第四节	石漠化治理·····	256
第五节	盐碱地治理·····	258
第六节	尾矿及重金属污染土壤修复·····	259
参考文献	·····	262

一、教学研究业绩

3. 编写教材

3.3 参编：“十四五”规划教材《生物化学》



国家林业和草原局普通高等教育“十四五”规划教材

立项证书

教材名称：生物化学

教材主编：张灵玲

立项编号：FGCU23A 0135

国家林业和草原局院校教材建设办公室



中国科技出版传媒股份有限公司

科学出版社“十四五”普通高等教育规划教材（第二批）

立项通知

福建农林大学：

根据《关于组织开展第二批科学出版社“十四五”普通高等教育规划教材申报的通知》，在全国各高校申报项目的基础上，经学术专家和出版专家评审，确定贵校以下教材入选第二批科学出版社“十四五”普通高等教育规划教材。

序号	选题名称	第一作者
1	基因工程（第二版）	何水林
2	生物化学	张灵玲
3	林火生态与管理	郭福涛

感谢贵校多年来对科学出版社的鼎力支持和帮助！热诚欢迎贵校教师与科学出版社共同努力，共同做好课程与教材建设工作。

中国科技出版传媒股份有限公司

（科学出版社）

2023年11月

总编部

10000015124

新形态教材

BIOCHEMISTRY

生物化学

张灵玲 主编



科学出版社

内 容 简 介

生物化学是开展生命科学研究的重要理论基础和技术。本教材内容可分为三部分：生物大分子的性质、结构，以及结构和功能之间的关系；核酸、蛋白质、糖和脂质 4 类大分子物质的新陈代谢；遗传信息的传递和调控。本教材沿着生物大分子结构与功能，以及物质能量代谢历程与调控的主线，全面阐述生物化学的基本理论，同时注重融入最新的科研进展，尤其突出在农林领域的研究情况，让学习内容尽量与农林领域各专业相吻合，使学生能够系统学习本专业涉及的生物化学知识，为今后开展本领域相关的科学研究奠定基础。本教材配备教学课件，扫描书中二维码可观看相关 3D 动画、3D 模型及彩色插图。

本教材是生物学相关专业的基础通用教材，适用于高等农业院校、理工院校、师范院校及综合性大学有关专业本科生，也可作为相关专业研究生、教师和科研工作者的参考书。

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学 / 张灵玲主编. —北京: 科学出版社, 2022.6

ISBN 978-7-03-072083-2

I. ①生… II. ①张… III. ①生物化学-高等学校-教材 IV. ①Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2022) 第 060769 号

责任编辑: 张静秋 / 责任校对: 郝甜甜

责任印制: 张 伟 / 封面设计: 蓝正设计

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京凌奇印刷有限责任公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2022年6月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2022年6月第一次印刷 印张: 19

字数: 511 000

定价: 59.80 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

生物化学

主 编 张灵玲

副主编 赵长江 杨婉莹 贾玉龙 牟少亮 赵伊英

编 委 (按姓氏拼音排序)

艾育芳 (福建农林大学)

文安燕 (贵州大学)

蔡汉阳 (福建农林大学)

许光治 (浙江农林大学)

贾玉龙 (贵州大学)

杨婉莹 (华南农业大学)

林 春 (云南农业大学)

易辉玉 (华南农业大学)

柳 林 (福建农林大学)

于高波 (黑龙江八一农垦大学)

楼 轶 (福建农林大学)

张灵玲 (福建农林大学)

马洪丽 (福建农林大学)

赵长江 (黑龙江八一农垦大学)

牟少亮 (福建农林大学)

赵伊英 (石河子大学)

史金铭 (东北林业大学)

左照江 (浙江农林大学)

王文斐 (福建农林大学)

科学出版社

北京

目 录

第一章 绪论 1

第一节 生物化学的研究内容 1

第二节 生物化学的形成与发展 2

第三节 近代生物化学在农林领域的发展与应用 2

第二章 核酸 5

第一节 概述 5

第二节 核酸的组成 5

第三节 核酸的结构 8

第四节 核酸的性质 23

第五节 核酸研究的主要技术 28

第六节 核酸的研究与应用 31

第三章 蛋白质 38

第一节 氨基酸 38

第二节 肽 47

第三节 蛋白质的组成与性质 49

第四节 蛋白质的结构 51

第五节 蛋白质结构与功能的关系 56

第六节 蛋白质研究的主要技术 59

第七节 蛋白质的研究与应用 63

第四章 糖 66

第一节 概述 66

第二节 糖的组成与结构 67

第三节 糖的性质 71

第四节 糖的功能 72

第五节 糖研究的主要技术 73

第六节 糖的研究与应用 74

第五章 脂质 76

第一节 概述 76

第二节 脂质的结构与性质 77

第三节 脂质的功能 84

第四节 脂质研究的主要技术 87

第五节 脂质的研究与应用 89

第六章 酶 92

第一节 概述 92

第二节 酶的组成及分类与命名 93

第三节 酶的结构特征 97

第四节 酶的催化机制 100

第五节 酶促反应动力学 104

第六节 酶活力调节 114

第七节 酶的研究与应用 118

第七章 维生素与辅酶 124

第一节 概述 124

第二节 水溶性维生素 124

第三节 脂溶性维生素 128

第八章 生物氧化与氧化磷酸化 131

第一节 概述 131

第二节 电子传递链 134

第三节 氧化磷酸化 137

第九章 新陈代谢 143

第一节 概述 143

第二节 分解代谢与合成代谢 144

第三节 代谢研究方法及应用 147

第十章 糖代谢 155

第一节 糖的分解 155

第二节 糖的合成 172

第三节 糖代谢的应用 178

第十一章 脂质代谢 181

第一节 脂质的分解 181

第二节 脂质的合成 190

第三节 脂质代谢的应用 202

第十二章 核酸代谢	205	第五节 蛋白质代谢的应用	273
第一节 核酸的分解	205	第十四章 次生代谢	276
第二节 核苷酸的合成	208	第一节 概述	276
第三节 DNA 的生物合成	215	第二节 次生代谢的主要类型	276
第四节 RNA 的生物合成	226	第三节 次生代谢的主要途径	283
第五节 基因工程	236	第四节 次生代谢的应用	285
第六节 核酸代谢的应用	242	第十五章 代谢调控	287
第十三章 蛋白质代谢	246	第一节 概述	287
第一节 蛋白质的分解	246	第二节 代谢网络	287
第二节 氨基酸的分解与转化	248	第三节 代谢调节	290
第三节 氨基酸的合成	256	主要参考文献	296
第四节 蛋白质的合成	262		

《生物化学》教学课件索取单

凡使用本书作为教材的主讲教师,填写索取单后扫描或拍照发送至联系人邮箱,可获赠教学课件一份。本活动解释权在科学出版社。

姓名:	职称:	职务:
电话:	QQ:	邮箱:
学校:	院系:	本门课程选课人数:

您所教授的其他课程及使用教材

课程:

书名:

出版社:

课程:

书名:

出版社:

您对本书的评价及修改建议:

联系人: 张静秋 编辑 电话: 010-64004576 邮箱: zhangjingqiu@mail.sciencep.com

一、教学研究业绩

3. 编写教材

3.4 参编：数字教材《生物化学》

入选证书

福建农林大学张灵玲：

您在中国科技出版传媒股份有限公司出版的《生物化学》（2024年4月出版）入选2024年高等教育数字教材创新发展会议典型案例。

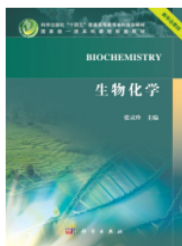
特颁此证。

全国高等学校教学研究中心
高等教育数字教材创新发展联盟
国家高等教育教材综合研究基地

2024年6月1日

《生物化学》数字教材. 2024. 科学出版社





生物化学

☆ 收藏

作者: 张灵玲
ISBN: 978-7-89505-174-4
出版社: 科学出版社
出版日期: 2024-04-28

已加入书架, 请下载客户端阅读

简介 目录

书名

生物化学

作者

张灵玲

出版社

科学出版社

ISBN

978-7-89505-174-4

出版日期

2024-04-28

内容简介

生物化学是开展生命科学研究的重要理论基础和技术。本教材内容可分为三部分: 生物大分子的性质、结构, 以及结构和功能之间的关系; 核酸、蛋白质、糖和脂类4类大分子物质的新陈代谢; 遗传信息的传递和调控。本教材沿着生物大分子结构与功能, 以及物质能量代谢历程与调控的主线, 全面阐述生物化学的基本理论, 同时注重融入最新的科研进展, 尤其突出在农林领域的研究情况, 让学习内容尽量与农林领域各专业相吻合, 使学生能够系统学习本专业涉及的生物化学知识, 为今后开展本领域相关的科学研究奠定基础。本教材为国家级一流本科课程配套教材, 配备思维导图、微课视频、在线交互习题、3D模型与3D动画、虚拟仿真实验、彩图、音频、名词注释、拓展阅读等丰富的数字资源, 读者可通过多种形式进行拓展学习。

责任编辑

张静秋

读者推荐

本教材是生物学相关专业的基础通用教材, 适用于高等农业院校、理工院校、师范院校及综合性大学有关专业本科生, 也可作为相关专业研究生、教师 and 科研工作者的参考书。

科学出版社数字教材

生物化学 生化2401班

目录

资源

委员会

前言

第一章 绪论

第二章 核酸

第三章 蛋白质

第四章 糖

第五章 脂类

第六章 酶

第七章 维生素与辅酶

第八章 生物氧化与氧化磷酸化

第九章 新陈代谢

第十章 糖代谢

第十一章 脂类代谢

第十二章 核酸代谢

第十三章 蛋白质代谢

第十四章 次生代谢

第十五章 代谢调控

《生物化学》编委会

主 编 张灵玲

副主编 赵长江 牟少亮

编 委 (按姓氏拼音排序)

艾育芳 (福建农林大学)

蔡汉阳 (福建农林大学)

陈疏影 (云南农业大学)

贾博为 (黑龙江八一农垦大学)

贾玉龙 (贵州大学)

鞠世杰 (黑龙江八一农垦大学)

李今煜 (福建农林大学)

廖丽娟 (福建农林大学)

梁喜龙 (黑龙江八一农垦大学)

林 春 (云南农业大学)

柳 林 (福建农林大学)

楼 轶 (福建农林大学)

马洪丽 (福建农林大学)

牟少亮 (福建农林大学)

史金铭 (东北林业大学)

王文斐 (福建农林大学)

文安燕 (贵州大学)

许光治 (浙江农林大学)

杨婉莹 (华南农业大学)

杨艳蕊 (福建农林大学)

易辉玉 (华南农业大学)

于高波 (黑龙江八一农垦大学)

张灵玲 (福建农林大学)

赵长江 (黑龙江八一农垦大学)

赵伊英 (石河子大学)

周 洁 (福建农林大学)

字淑慧 (云南农业大学)

左照江 (浙江农林大学)

页数: 1/1

当前页: 1

设计字数: 1423字

二、科研项目

1. 主持

1.1 关于“家蚕钙蛋白酶 **calpain** 参与切割自噬—凋亡开关蛋白 **BmATG6** 的研究”项目资助批准的通知

关于国家自然科学基金资助项目批准及有关事项的通知

易辉玉 先生/女士：

根据《国家自然科学基金条例》的规定和专家评审意见，国家自然科学基金委员会（以下简称自然科学基金委）决定批准资助您的申请项目。项目批准号：

31702065，项目名称：家蚕钙蛋白酶calpain参与切割自噬一凋亡开关蛋白BmATG6的研究，直接费用：25.00万元，项目起止年月：2018年01月至2020年12月，有关项目的评审意见及修改意见附后。

请尽早登录科学基金网络信息系统（<https://isisn.nsfc.gov.cn>），获取《国家自然科学基金资助项目计划书》（以下简称计划书）并按要求填写。对于有修改意见的项目，请按修改意见及时调整计划书相关内容；如对修改意见有异议，须在计划书电子版报送截止日期前提出。**注意：请严格按照《国家自然科学基金资助项目资金管理办法》填写计划书的资金预算表，其中，劳务费、专家咨询费科目所列金额与申请书相比不得调增。**

计划书电子版通过科学基金网络信息系统（<https://isisn.nsfc.gov.cn>）上传，由依托单位审核后提交至自然科学基金委进行审核。审核未通过者，返回修改后再行提交；审核通过者，打印为计划书纸质版（一式两份，双面打印），由依托单位审核并加盖单位公章后报送至自然科学基金委项目材料接收工作组。计划书电子版和纸质版内容应当保证一致。

向自然科学基金委提交和报送计划书截止时间节点如下：

- 1、提交计划书电子版截止时间为**2017年9月11日16点**（视为计划书正式提交时间）；
- 2、提交计划书电子修改版截止时间为**2017年9月18日16点**；
- 3、报送计划书纸质版截止时间为**2017年9月26日16点**。

请按照以上规定及时提交计划书电子版，并报送计划书纸质版，未说明理由且逾期不报计划书者，视为自动放弃接受资助。

附件：项目评审意见及修改意见表

国家自然科学基金委员会
生命科学部
2017年8月17日

二、科研项目

1. 主持

1.2 “钙蛋白酶参与调控家蚕抗菌肽表达的功能研究”项目合同书

受理编号: c21140500002330

项目编号: 2021A1515010907

文件编号: 粤基金字〔2021〕4号

广东省基础与应用基础研究基金项目 合同书

项目名称: 钙蛋白酶参与调控家蚕抗菌肽表达的功能研究

项目类别: 广东省自然科学基金-面上项目

项目起止时间: 2021-01-01 至 2023-12-31

管理单位(甲方): 广东省基础与应用基础研究基金委员会

依托单位(乙方): 华南农业大学

通讯地址: 广东省广州市天河区五山路483号

邮政编码: 510642

单位电话: 020-85283435

项目负责人: 易辉玉

联系电话: 02085284735



(广东科技微信公众号)



(查看合同书信息)



(受理纸质材料二维码)

广东省基础与应用基础研究
基金委员会
二〇二〇年制

填写说明

一、项目合同书/任务书内容原则上要求与申报书相关内容保持一致，不得无故修改。

二、项目承担单位通过广东省科技业务管理阳光政务平台下载项目合同书/任务书，按要求完成签名盖章后提交至省科技厅受理窗口。

三、签名盖章说明。请分别在单位工作分工及经费分配情况页、人员信息页、签约各方页等地方按要求签字或盖章，签章不合规或错漏将不予受理。其中，人员信息页要求所有参与人员本人亲笔签名，代签或印章无效，漏签将不予受理。

四、本合同书/任务书自签字并加盖公章之日起生效，各方均应负本任务书的法律责任，不应受机构、人事变动影响。

一、主要研究内容和要达到的目标

（一）主要研究内容

（1）微生物诱导家蚕幼虫或BmN细胞BmCalpains和抗菌肽基因的表达

①采用注射和添食的方法，利用大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及其细胞壁组分LPS和PGN对家蚕5龄幼虫进行免疫诱导；②利用大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的细胞壁组分LPS和PGN对BmN细胞进行免疫诱导；③qPCR检测家蚕幼虫体壁、马氏管、脂肪体和中肠组织以及BmN细胞中BmCalpains和抗菌肽基因BmCecropin、BmDefensin、BmAttacin、BmLebocin、BmEnbocin、BmMoricin和BmGloverin的表达，初步筛查和确认免疫诱导表达的目标BmCalpains和抗菌肽基因。

（2）过表达和RNAi目标BmCalpai基因对抗菌肽基因表达的影响

分别构建过表达的载体和RNAi的siRNA，转染BmN细胞获得目标BmCalpains过表达或RNAi的细胞，检测和确认经LPS和PGN免疫诱导后BmN细胞中目标抗菌肽的表达。

（3）BmCalpain基因敲除家蚕抗菌肽基因的表达

结合（1）和（2）中的研究结果，将关键BmCalpain基因在家蚕中进行敲除，qPCR检测经微生物等侵染后家蚕幼虫组织中抗菌肽的表达，并统计分析家蚕的致死率等。

（二）研究目标

（1）确认BmCalpains参与调控抗菌肽表达的功能。

（2）确认参与调控家蚕抗菌肽表达的BmCalpain家族成员及其所调控的抗菌肽种类。

二、项目预期获得的研究成果及形式

论文及专著情况	国家统计局刊物以上刊物 发表论文（篇）		2		科技报告（篇）		1	
	其中被SCI/EI/ISTP收录 论文数（篇）		1		培养人才（人）		2	
	专著（册）		0		引进人才（人）		0	
专利情况(项)	发明专利		实用新型专利		外观设计专利		国外专利	
	申请	授权	申请	授权	申请	授权	申请	授权
	0	0	0	0	0	0	0	0

三、项目进度和阶段目标

(一) 项目起止时间: 2021-01-01 至 2023-12-31		
(二) 项目实施进度及阶段主要目标:		
开始日期	结束日期	主要工作内容
2021-01-01	2021-12-31	(1) 采用注射和添食方法, 利用微生物及其组分分别对家蚕5龄幼虫进行免疫诱导, 解剖获取组织样品。 (2) 利用微生物组分对BmN细胞进行免疫诱导, 收集细胞样品。 (3) qPCR检测目的基因的表达, 初步筛查目标BmCalpains和抗菌肽基因。
2022-01-01	2022-12-31	(1) 构建过表达载体, BmN细胞中过表达目标BmCalpain基因, 利用微生物组分对BmN细胞进行免疫诱导, 收集细胞样品。 (2) 构建RNAi的siRNA, BmN细胞中RNAi目标BmCalpain基因, 利用微生物组分对BmN细胞进行免疫诱导, 收集细胞样品。 (3) qPCR检测目的基因的表达, 确认目标BmCalpains对相应抗菌肽基因表达的调控。 (4) 确定基因敲除的目标BmCalpain, 构建高质量sgRNA和Case9-mRNA, 注射家蚕蚕卵。 (5) 通过繁殖育种获得BmCalpain基因敲除家蚕。
2023-01-01	2023-12-31	(1) qPCR检测基因敲除家蚕各组织中BmCalpains及其对应抗菌肽基因的表达。 (2) 微生物及其组分侵染基因敲除家蚕幼虫, 统计家蚕的致死率, 检测BmCalpains及对应抗菌肽基因的表达。 (3) 补充完善实验。 (4) 论文写作与投稿。

四、项目总经费及省基金委经费预算

1. 省基金委经费下达总额：（大写）壹拾万圆整；（小写）10万元；					
2. 省基金委经费年度下达计划：					
年度	2021 年	年	年	年	年
经费(万元)	10.00				
3. 总经费及省基金委经费开支预算计划：					
经费筹集情况：					(单位：万元)
省基金委经费	自筹资金				合计
	自有资金	贷款	地方政府投入	其它	
10.00	0	0	0	0	10.00
政府部门、境外资金及其他资金投入情况说明：	无				
与本项目相关的其他经费来源		(单位：万元)			
其他计划资助经费：		0			
单位配套经费：		0			
其他经费资助：		0			
其他经费来源合计：		0.00			

五、人员信息

项目负责人								
姓名	证件号码	年龄	性别	职称	学历	在项目中承担的任务	所在单位	签名
易辉玉	430422198111071765	40	女	讲师	博士研究生	项目负责人	华南农业大学	易辉玉

项目组主要成员								
姓名	证件号码	年龄	性别	职称	学历	在项目中承担的任务	所在单位	签名
黄志君	440230197108190831	50	男	高级实验师	博士研究生	细胞培养、转染及家蚕基因敲除	华南农业大学	黄志君
关金标	445323199605290935	25	男	未取得	本科	家蚕幼虫、细胞的免疫诱导和目的基因qPCR检测	华南农业大学	关金标
伍道聪	440682199706210633	24	男	未取得	本科	过表达和RNAi实验	华南农业大学	伍道聪
张萌萌	140522200012016820	21	女	未取得	其他	基因敲除家蚕的筛选与饲养	华南农业大学	张萌萌

六、工作分工及经费分配

承担/参与单位名称 (盖章)	工作分工	总经费分摊 (万元)	省基金委经费分配 (万元)
华南农业大学	负责本项目	10.00	10.00
	合计	10.00	10.00

七、合同条款

第一条 甲方与乙方根据《中华人民共和国合同法》及国家有关法规和规定，为顺利完成（2021）年钙蛋白酶参与调控家蚕抗菌肽表达的功能研究 专项项目（文件编号：粤基金字（2021）4号）经协商一致，特订立本合同，作为甲乙双方在项目实施管理过程中共同遵守的依据。

第二条 甲方的权利义务：

1. 按合同书规定进行经费核拨的有关工作协调。
2. 根据甲方需要，在不影响乙方工作的前提下，定期或不定期对乙方项目的实施情况和经费使用情况进行检查或抽查。
3. 根据《广东省科技计划项目信用管理办法(试行)》对乙方进行科技计划信用管理。

第三条 乙方的权利义务：

1. 确保落实自筹经费及有关保障条件。
2. 乙方是项目资金管理的责任主体，应当建立健全科研项目资金管理制度，严格按照省科技经费使用范围和有关规定管好用好财政资金；应当按合同书规定，对甲方核拨的经费实行专款专用，单独列账，并随时配合甲方进行监督检查。
3. 实施“包干制”的面上项目及青年基金项目，依托单位应参照国家杰出青年科学基金试点项目经费使用“包干制”要求，制定经费使用“包干制”内部管理规定。项目经费支出应实际用于研发活动相关支出，使用范围限于设备费、材料费、测试化验加工费、燃料动力费、差旅/会议/国际合作与交流费、出版/文献/信息传播/知识产权事务费、劳务费、专家咨询费、依托单位管理费用、绩效支出以及其他合理支出。依托单位管理费用由依托单位根据实际管理支出情况与项目负责人协商确定。绩效支出由项目负责人根据实际科研需要和相关薪酬标准自主确定，依托单位按照现行工资制度进行管理。其余用途经费无额度限制，由项目负责人根据实际需要自主决定使用。项目验收时应提交经费决算表。
4. 项目负责人是项目资金使用的直接责任人，对资金使用的合规性、合理性、真实性和相关性承担法律责任。
5. 使用财政资金采购设备、原材料等，按照《广东省实施〈中华人民共和国招标投标法〉办法》有关规定，符合招标条件的须进行招标。
6. 项目合同任务完成后，以合同书规定的任务、指标及经费投入等提前完成的，乙方可按照《广东省省级科技计划项目结题管理实施细则（试行）》提出验收结题申请，并按甲方要求做好项目验收结题工作。
7. 若项目发生需要终止结题的情况，乙方须按照《广东省省级科技计划项目结题管理的实施细则（试行）》提出终止结题申请，并按甲方要求做好项目终止结题工作。
8. 在每年规定时间内向甲方如实提交上年度工作情况报告，报告内容包含上年度项目进展情况、经费决算和取得的成果等。
9. 按照国家和省有关规定，提交科技报告及其他材料。
10. 利用甲方的经费获得的研究成果，项目负责人和参与者应当注明获得“广东省基础与应用基础研究基金（英文：Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation）（项目编号）”资助或作有关说明。

11. 乙方要恪守科学道德准则，遵守科研活动规范，践行科研诚信要求，不得抄袭、剽窃他人科研成果或者伪造、篡改研究数据、研究结论；不得购买、代写、代投论文，虚构同行评议专家及评议意见；不得违反论文署名规范，擅自标注或虚假标注获得科技计划（专项、基金等）等资助；不得弄虚作假，骗取科技计划（专项、基金等）项目、科研经费以及奖励、荣誉等；不得有其他违背科研诚信要求的行为。

12. 确保本项目开展的研究工作符合我国科研伦理管理相关规定。

第四条 在履行本合同的过程中，如出现广东省相关政策法规重大改变等不可抗力情况，甲方有权对所核拨经费的数量和时间进行相应调整。

第五条 在履行本合同的过程中，当事人一方发现可能导致项目整体或部分失败的情形时，应及时通知另一方，并采取适当措施减少损失，没有及时通知并采取适当措施，致使损失扩大的，应当就扩大的损失承担责任。

第六条 本项目技术成果的归属、转让和实施技术成果所产生的经济利益的分享，除双方另有约定外，按国家和广东省有关法规执行。

第七条 根据项目具体情况，经双方另行协商订立的附加条款，作为本合同正式内容的一部分，与本合同具有同等效力。

第八条 本合同一式三份，各份具有同等效力。甲、乙方及项目负责人各执一份，三方签字、盖章后即生效，有效期至项目结题后一年内。各方均应负合同的法律责任，不应受机构、人事变动的影响。

第九条 乙方必须接受甲方聘请的本项目合同监理单位的监督和管理。监理单位按照甲方赋予的权利对本项目合同的履行进行审核、进度调查，对项目合同变更、经费使用情况进行监督管理及组织项目验收。

说明：1. 本合同书中，凡是当事人约定无需填写的内容，应在空白处划（/）。

2. 委托代理人签订本合同书的，应出具合法、有效的委托书。

八、本合同签约各方

管理单位（甲方）：

广东省基础与应用基础研究基金委员会（盖章）



法定代表人（或法人代理）：

曾路

（签章）

曾路

2021 年 03 月 25 日

依托单位（乙方）：华南农业大学

（盖章）

法定代表人（或法人代理）：

刘雅红

（签章）



安沛

联系人（项目主管）姓名：

安沛

（签章）

Email: 414484016@qq.com

电话: 020-85283435 / 13535577893

开户单位名称：华南农业大学

开户银行名称：广东广州工行五山支行

2021年 04月 13日

开户银行帐号：3602002609000310520

年 月 日

联系人（项目负责人）姓名：易辉玉

（签名）

易辉玉

Email: yihy@scau.edu.cn

电话: 02085284735

2021 年 4 月 12 日

庚戌



二、科研项目

2. 主参

2.1 “绿僵菌素 A 对烟粉虱与家蚕的比较毒理研究”国家自然科学基金委员会资助项目计划书



项目批准号	U1901205
申请代码	L06
归口管理部门	
依托单位代码	51064208A0499-0932



U19012051012474

国家自然科学基金委员会 资助项目计划书

资助类别：联合基金项目

亚类说明：重点支持项目

附注说明：NSFC-广东联合基金

项目名称：绿僵菌素A对烟粉虱与家蚕的比较毒理研究

直接费用：255万元

执行年限：2020.01-2023.12

负责人：胡琼波

通讯地址：广州市天河区五山路483号 华南农业大学 资源环境学院楼636室

邮政编码：510642

电话：13580525674

电子邮件：hqbscau@scau.edu.cn

依托单位：华南农业大学

联系人：倪慧群

电话：020-85280070

填表日期：2019年12月04日

国家自然科学基金委员会制



国家自然科学基金委员会资助项目计划书填报说明

- 一、项目负责人收到《关于国家自然科学基金资助项目批准及有关事项的通知》（以下简称《批准通知》）后，请认真阅读本填报说明，参照国家自然科学基金相关项目管理办法及《国家自然科学基金资助项目资金管理办法》（请查阅国家自然科学基金委员会官方网站首页“政策法规”栏目），按《批准通知》的要求认真填写和提交《国家自然科学基金委员会资助项目计划书》（以下简称《计划书》）。
- 二、填写《计划书》时要求科学严谨、实事求是、表述清晰、准确。《计划书》经国家自然科学基金委员会相关项目管理部门审核批准后，将作为项目研究计划执行和检查、验收的依据。
- 三、《计划书》各部分填写要求如下：
 - （一）简表：由系统自动生成。
 - （二）摘要及关键词：各类获资助项目都必须填写中、英文摘要及关键词。
 - （三）项目组主要成员：计划书中列出姓名的项目组主要成员由系统自动生成，与申请书原成员保持一致，不可随意调整。如果批准通知中“项目评审意见及修改意见表”中“对研究方案的修改意见”栏目有调整项目组成员相关要求的，待项目开始执行后，按照项目成员变更程序另行办理。
 - （四）资金预算表：根据批准资助的直接费用，按照《国家自然科学基金项目预算表编制说明》填报资金预算表和预算说明书。国家重大科研仪器研制项目、重大项目还应按照预算评审后批复的直接费用各科目金额填报资金预算表、预算说明书及相应的预算明细表。
 - （五）正文：
 1. 面上项目、青年科学基金项目、地区科学基金项目：如果《批准通知》中没有修改要求的，只需选择“研究内容和研究目标按照申请书执行”即可；如果《批准通知》中“项目评审意见及修改意见表”中“对研究方案的修改意见”栏目明确要求调整研究期限和研究内容等的，须选择“根据研究方案修改意见更改”并填报相关修改内容。
 2. 重点项目、重点国际（地区）合作研究项目、重大项目、国家重大科研仪器研制项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，根据《批准通知》的要求填写研究（研制）内容，不得自行降低、更改研究目标（或仪器研制的技术性能与主要技术指标以及验收技术指标）或缩减研究（研制）内容。此外，还要突出以下几点：
 - （1）研究的难点和在实施过程中可能遇到的问题（或仪器研制风险），拟采用的研究（研制）方案和技术路线；
 - （2）项目主要参与者分工，合作研究单位之间的关系与分工，重大项目还需说明课题之间的关联；
 - （3）详细的年度研究（研制）计划。



3. 国家杰出青年科学基金、优秀青年科学基金和海外及港澳学者合作研究基金项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，按下列提纲撰写：
 - (1) 研究方向；
 - (2) 结合国内外研究现状，说明研究工作的学术思想和科学意义（限两个页面）；
 - (3) 研究内容、研究方案及预期目标（限两个页面）；
 - (4) 年度研究计划；
 - (5) 研究队伍的组成情况。
4. 国家自然科学基金基础科学中心项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，应当根据评审委员会和现场考察专家组的意见和建议，进一步完善并细化研究计划，作为评估和验收的依据。按下列提纲撰写：
 - (1) 五年拟开展的研究工作（包括主要研究方向、关键科学问题与研究内容）；
 - (2) 研究方案（包括骨干成员之间的分工及合作方式、学科交叉融合研究计划等）；
 - (3) 年度研究计划；
 - (4) 五年预期目标和可能取得的重大突破等；
 - (5) 研究队伍的组成情况。
5. 对于其他类型项目，参照面上项目的方式进行选择和填写。



简表

项目负责人信息	姓 名	胡琼波	性 别	男	出生年月	1963年04月	民 族	汉族
	学 位	博士			职称	教授		
	是否在站博士后	否			电子邮件	hqbscau@scau.edu.cn		
	电 话	13580525674			个人网页			
	工 作 单 位	华南农业大学						
	所 在 院 系 所	农学院						
依托单位信息	名 称	华南农业大学					代码	51064208A0499
	联 系 人	倪慧群			电子邮件	kyc.jhk@scau.edu.cn		
	电 话	020-85280070			网站地址	http://kjc.scau.edu.cn/		
合作单位信息	单 位 名 称							
项目基本信息	项 目 名 称	绿僵菌素A对烟粉虱与家蚕的比较毒理研究						
	资 助 类 别	联合基金项目				亚 类 说 明	重点支持项目	
	附 注 说 明	NSFC-广东联合基金						
	申 请 代 码	L06:生物多样性保护领域				C140203:园艺作物害虫		
	基 地 类 别	亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室						
	执 行 年 限	2020.01-2023.12						
	直 接 费 用	255万元						



项目摘要

中文摘要:

烟粉虱是我国重大害虫,绿僵菌素A(DA)是绿僵菌产生的一种抗生素,对烟粉虱有效,对鳞翅目昆虫活性更高,但作用机理不明。本项目拟研究DA对B型烟粉虱与家蚕的比较毒理:首先,表达与制备前期鉴定的71种疑似DA结合蛋白,采用生物膜光干涉技术筛选出DA高亲和蛋白;研究不同剂量DA处理引起的昆虫症状及组织病理变化,通过HPLC-MS检测DA在虫体内的分布规律,确证DA的靶标器官/组织;采用原位杂交等方法研究高亲和蛋白的器官/组织分布与亚细胞定位,敲除高亲和蛋白基因考察昆虫对DA敏感性的变化,采用双分子荧光等方法测定DA对蛋白互作功能的影响,鉴定并确证靶标蛋白;点突变靶标蛋白基因,X射线衍射技术解析靶标蛋白结构,明确靶标蛋白与DA的结合模式;利用MOE软件分析药效团,优化靶标蛋白抑制剂的分子结构,筛选更高活性的化合物。研究结果可扩展烟粉虱的防控手段,强化真菌杀虫剂的基础研究,促进我国新型杀虫剂的原创。

Abstract:

Bemisia tabaci is a very important pest in China. Destruxin A (DA) is an insecticidal antibiotic isolated from the entomopathogenic fungi, *Metarhizium* spp. DA has substantial bioactivity to *Bemisia tabaci* and better insecticidal effects to Lepidopteran. However, the action mechanisms of DA to insects have not been elucidated yet. In this proposal, we intend to research the comparative toxicology of DA against *Bemisia tabaci* and *Bombyx mori*, which includes five experiments: (1) screening of high DA-affinity proteins by means of bio-layer light interferometry (BLI) after expression and purification of 71 potential DA-binding proteins identified from the previous experiments. (2) confirmation of the DA target organism/tissue by evaluating the poisoning symptoms and histopathological changes of insects with different DA dose treatments, and analyzing in vivo distribution of DA with HPLC-MS technology. (3) identification and validation of the DA-target protein through testing the expression in organs/tissues and the subcellular localization of the higher DA-affinity proteins by situ hybridization, surveying the relationship between the insect's susceptibility to DA and the higher DA-affinity proteins genes knocked-down, and investigating the influences of DA on the functions of higher DA-affinity proteins by means of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) systems, etc.. (4) exploration of the binding mode between DA and its target protein through detecting the key amino acids and elucidating the 3D structure of DA-target proteins by means of gene point mutation, protein crystallization, and X-ray diffraction analysis. (5) optimization of molecular structure of the target protein inhibitors and select higher bioactive compounds based on the pharmacophore analysis through MOE software, chemical synthesis and bioassay technology. The results of this research will broaden the control technology of *Bemisia tabaci*, strengthen the basic researches of the myco-insecticides, as well as promote the innovation of noval insecticides in China.

关键词(用分号分开): 绿僵菌素; 烟粉虱; 家蚕; 作用靶标; 鉴定

Keywords(用分号分开): destruxin; *Bemisia tabaci*; *Bombyx mori*; action target; identification



项目组主要成员

编号	姓名	出生年月	性别	职称	学位	单位名称	电话	证件号码	项目分工	每年工作时间（月）				
1	胡琼波	1963. 04	男	教授	博士	华南农业大学	13580525674	430602196304142538	项目负责人	8				
2	翁群芳	1972. 02	女	副研究员	博士	华南农业大学	13676269558	441421197202215527	DA作用的靶组织/器官	5				
3	周琢强	1969. 03	男	副教授	博士	华南农业大学	13450495367	362401196903022075	靶标蛋白抑制剂结构优化与筛选	5				
4	易辉玉	1981. 11	女	讲师	博士	华南农业大学	13924120526	430422198111071765	靶标蛋白鉴定	6				
5	王菁菁	1993. 07	女	博士生	硕士	华南农业大学	18826487002	460102199307312725	靶标蛋白的鉴定	11				
6	尹飞	1984. 04	女	博士生	硕士	华南农业大学	13668929917	370982198404163863	靶标器官/组织的确证	11				
7	彭海涛	1995. 10	男	硕士生	学士	华南农业大学	18814116341	430623199510016116	靶标蛋白与DA的结合模式研究	11				
8	牛小燕	1995. 03	女	硕士生	学士	华南农业大学	15237359250	411081199503282086	靶标蛋白抑制剂的优化与筛选	11				
9	肖苗苗	1992. 12	女	硕士生	学士	华南农业大学	18256110252	340322199212031268	靶标蛋白与DA的结合模式研究	11				
10	关雪	1994. 12	女	硕士生	学士	华南农业大学	15626227182	341222199412075543	DA靶标蛋白确证	11				
总人数			高级		中级		初级		博士后		博士生		硕士生	
10			3		1		0		0		2		4	



国家自然科学基金项目直接费用预算表（定额补助）

项目批准号：U1901205

项目负责人：胡琼波

金额单位：万元

序号	科目名称	金额
1	项目直接费用合计	255.0000
2	1、设备费	6.0000
3	(1)设备购置费	6.0000
4	(2)设备试制费	0.00
5	(3)设备升级改造与租赁费	0.0000
6	2、材料费	66.0000
7	3、测试化验加工费	55.0000
8	4、燃料动力费	5.0000
9	5、差旅/会议/国际合作与交流费	50.0000
10	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	9.0000
11	7、劳务费	60.0000
12	8、专家咨询费	2.0000
13	9、其他支出	2.0000



预算说明书（定额补助）

（请按照《国家自然科学基金项目预算表编制说明》等的有关要求，对各项支出的主要用途和测算理由，以及合作研究外拨资金、单价≥10万元的设备费等内容进行必要说明。）

本项目总预算经费**255.0万元**，主要支出明细如下：

1. 设备费6万元，用于购置：

PCR仪1台，**4.0万元**；摇床1台或旋转蒸发仪1台，**2.0万元**。

2. 材料费66.0万元，主要用于购买下列实验材料：

（1）分子生物学试剂盒及工具酶：用于各种载体的构建、基因的克隆等，小计22.0万元。

DNA提取试剂盒（200次反应/个）：1500元×20个=**3.0万元**。

RNA提取试剂盒（200次反应/个）：约2000元×20个=**4.0万元**。

反转录试剂盒（100次反应/个）：1500元×20个=**3.0万元**。

转染试剂盒：3000元/1mL×10个=**3.0万元**。

克隆连接试剂盒：约1000元/个×20个=**2.0万元**。

凝胶回收试剂盒（250次反应/个）：约4000元/盒×5个=**2.0万元**。

Real Time PCR扩增试剂盒（TaKaRa）（100次/个）：约1500元×10个=**1.5万元**。

蛋白质提取试剂盒：约500元×20个=**1.0万元**。

普通taq酶（5mL）：500元×10=**0.5万元**。

定量taq酶（5mL）：1000元×10=**1.0万元**。

各种限制性核酸内切酶（XbaI、XhoI、KpnI、PstI，...等）：250元/支×20=**0.5万元**。

其他酶（T4 DNA 连接酶、DNA聚合酶等）：500元/支×10=**0.5万元**。

（2）用于蛋白表达纯化与互作分析试剂，小计18.0万元。

载体质粒：1000元×20=**2.0万元**。

SDS-PAGE制胶试剂盒：250元/盒×20=**0.5万元**。

各种抗体（50μL）：500元×20=**1.0万元**。

WB发光液（100mL）：2000元×10=**2.0万元**。

PVDF膜：2000元/盒×10=**2.0万元**。

蛋白纯化填料（100mL）：2000元×10=**2.0万元**。

CM5芯片：2000/片×10=**2.0万元**。

蛋白分析用各种缓冲液：1250元/瓶×20=**2.5万元**。

酵母双杂交表达载体与菌株：**1.0万元**。

BiFC表达载体：**1.0万元**。

昆虫细胞系：4000元/个×5个=**2.0万元**。

（3）各种培养基组分，用于微生物、细胞系的培养等，小计8.0万元。

澳胎牛血清：7500元/瓶×20=**1.5万元**。

培养基（Gibco和hyclone）：500元/瓶×20=**1.0万元**。

培养瓶（Nunc）：750元/箱×20=**1.5万元**。

进口琼脂粉（500克/瓶）：150元×100=**1.5万元**；

昆虫细胞培养基：1000元/瓶×25 瓶=**2.5万元**；

（4）各种常规生化试剂、标准品、抗生素等，小计13.0万元。

核酸染料：500元/1mL×20=**1.0万元**。

组织、细胞各类免疫组化染色剂：2000元/个包装×5=**1.0万元**。

核酸标准分子量：约500元/个×20个=**1.0万元**。

蛋白质标准分子量：约500元/个×20个=**1.0万元**。



绿僵菌素同系物标准品：7000元/种×10种=7.0万元。

羧苄青霉素：250元/克×20克=0.5万元；

潮霉素：1000元/克×10克=1.0万元；

链霉素（每瓶100克）：500元/瓶×10瓶=0.5万元；

(5) 各种耗材，小计5.0万元。

液氮：300元/罐（35升）×5=0.15万元；

96孔酶标板（Invitrogen）：50元/块×50=0.25万元；

96孔细胞培养板（4块/包）（Invitrogen）：150元/包×10=0.15万元；

LightCycler480 Multiwell plate 96（Roche）（5×10块板/箱）：4500元×1箱=0.45万元；

普通Eppendorf管、普通微量移液器枪头：平均25元/包×200=0.5万元；

乳胶手套：500元/箱×10=0.5万元；

PE手套：200元/箱×10=0.2万元；

Parafilm膜：150元/卷×20=0.3万元；

培养皿：5元/套×2000套=1.0万元；

其他材料：1.5万元。

3. 测试化验加工费55.0万元，主要用于下列项目支出：

蛋白质互作分析，150个样×3000元/样=45.0万元。

基因测序，1000个片断×60元/片断=6.0万元。

蛋白测序，200个片断×200元/片断=4.0万元。

4. 燃料动力费5.0万元，主要用于下列项目支出：

养虫室运行电费，500度电/月×48个月×1.5元/度电=3.6万元。

超低温冰箱等电器运行电费，194.44度电/月×48个月×1.5元/度电=1.4万元。

5. 差旅/会议/国际合作与交流费50.0万元，主要用于下列支出：

差旅费与国内会议：每年15人次参加国内学术会议与学术交流，15人次×5000元/人次×4年=30.0万元。

6人次出国参加国际学术会议与交流：6人次×(机票1.5万元+住宿费0.6万元+公杂费0.4万元+其他费0.25万元)=16.5万元。

邀请2人次境外专家来华交流访问：2人次×(机票1.25万元+住宿费0.20万元+伙食费0.20万元+其他费0.10万元)=3.5万元。

6. 出版/文献/信息传播/知识产权事务费9.0万元，主要用于下列支出：

发表6篇学术论文的版面费：6篇×版面费1.5万元=9.0万元。

7. 劳务费60.0万元：

参与本项目的2名博士研究生，每年劳务费6万元×4年=24.0万元。

参与本项目的4名硕士研究生，每年劳务费9万元×4年=36.0万元。

8. 专家咨询费2.0万元，用于邀请专家讨论咨询研究工作中的问题。

9. 其他费2.0万元，用于在研究过程中发生的除直接费用其他开支科目之外的其他支出。

项目负责人签字：

科研部门公章：

财务部门公章：



正文

目录

1 研究内容	1
1.1 疑似 DA 结合蛋白与 DA 的亲和力测定	1
1.2 靶标器官/组织的确证	2
1.3 靶标蛋白的鉴定	2
1.4 靶标蛋白与 DA 的结合模式研究	2
1.5 靶标蛋白抑制剂的结构优化与筛选	2
2 研究目标	2
3 拟解决的关键科学问题	3
4 研究方法	3
4.1 疑似 DA 结合蛋白与 DA 的亲和力测定	3
4.2 靶标器官/组织的确证	4
4.3 靶标蛋白的鉴定	5
4.4 靶标蛋白与 DA 的结合模式研究	6
4.5 靶标蛋白抑制剂的结构优化与筛选	6
5 研究难点、风险与解决措施	7
6 年度研究计划及预期研究结果	8
6.1 年度研究计划	8
6.2 预期研究结果	9
7 项目组成员及其分工	9

1 研究内容

1.1 疑似 DA 结合蛋白与 DA 的亲和力测定

以 71 种已经鉴定的疑似 DA 结合蛋白为供试蛋白，在原核细胞中表达供试蛋白基因，离体条件下测定其与 DA 亲和力，筛选出亲和力最高的几种蛋白。



1.2 靶标器官/组织的确证

以不同剂量的 DA 处理 B 型烟粉虱与家蚕,比较研究 DA 在各器官/组织中的分布,以及引起的中毒症状与组织病理变化,发现昆虫中对 DA 最敏感的器官/组织,明确 DA 的靶标器官/组织。

1.3 靶标蛋白的鉴定

1.3.1 高亲和蛋白在靶标器官/组织的分布与亚细胞定位

考察高亲和蛋白的靶标器官/组织分布与亚细胞定位,初步鉴定出 DA 靶标蛋白。

1.3.2 高亲和蛋白与 DA 活性的影响

分别沉默或敲除 B 型烟粉虱与家蚕的 DA 高亲和蛋白基因后,对比研究昆虫对 DA 的敏感性变化。

1.3.3 DA 对高亲和蛋白互作功能的影响

对比研究在昆虫细胞中 DA 不同剂量处理对 DA 高亲和蛋白功能的影响。

1.4 靶标蛋白与 DA 的结合模式研究

1.4.1 靶标蛋白基因点突变对与 DA 亲和性的影响

点突变 DA 靶标蛋白的相关氨基酸基因密码,考察突变蛋白与 DA 互作及功能的变化,发现靶标蛋白与 DA 结合的关键氨基酸位点。

1.4.2 DA 靶标蛋白的结晶与 3D 结构研究

结晶靶标蛋白,解析其 3D 结构,明确靶标蛋白与 DA 的结合模式。

1.5 靶标蛋白抑制剂的结构优化与筛选

基于 DA 与靶标蛋白的结合模式,利用药效团技术,通过软件设计一批新型分子,化学合成并筛选出活性更高的新化合物。

2 研究目标

通过比较研究 DA 对 B 型烟粉虱与家蚕的影响,从中毒症状、组织病理变化到分子



靶标研究 DA 的杀虫机理，二种昆虫中相互验证实验结果，达到如下研究目标：

(1) 明确二种昆虫中 DA 作用的靶标器官/组织及其各自的特点，更深入地理解半翅目昆虫与鳞翅目昆虫对 DA 敏感性不同的差异。

(2) 明确二种昆虫中 DA 的靶标蛋白及其各自的特点，深入认识虫生真菌与昆虫的分子互作机制，促进真菌杀虫剂的发展与应用，拓宽烟粉虱生物防治途径。

(3) 明确 DA 与靶标蛋白的结合模式，优化靶标蛋白抑制的分子结构，筛选出 1-3 种具有比 DA 更高活性的新型潜在杀虫剂。以期发展防治烟粉虱的新型代替药剂，克服与延缓烟粉虱的抗药性，提高防治效果，减少农药施用，增进环境与食物安全。

3 拟解决的关键科学问题

(1) 解析 DA 毒杀 B 型烟粉虱与家蚕的机理与各自的特点，也就是要明确各自的靶标器官/组织与靶标蛋白。烟粉虱是半翅目微型刺吸式口器害虫，而家蚕属于重要的鳞翅目经济昆虫，二者的生物学特点与行为习性差异很大，那么在器官/组织与分子水平上认识 DA 对二者的毒理有何异同，将能够更好地回答 DA 的昆虫的毒性机理问题。

(2) 明确 DA 与靶标蛋白的结合模式，也就是要解析靶标蛋白与 DA 的结合位点及其相互作用规律，进一步揭示靶标蛋白抑制剂结构与活性关系，发现新型高活性化合物。

4 研究方法

4.1 疑似 DA 结合蛋白与 DA 的亲合力测定

以申请人前期筛选的 71 种疑似 DA 结合蛋白为供试蛋白（表 1，目前已经完成其中 15 种蛋白的相关研究工作），参照本项目组前期工作方法（参照 Zhang H, Hu W, Xiao M, Ou S, Hu Q: *J Agri Food Chem* 2017, **65**(45):9850-9854）按以下步骤开展实验研究。

4.1.1 供试蛋白基因的克隆与原核表达载体构建

克隆或人工合成目标基因序列，添加 his 标签，通过限制性酶切位点 Nde I 和 Hind III 将上述蛋白的基因序列连接到 pET30a 载体上。对于那些分子量较大的蛋白（分子量 > 90 kDa），如难以表达，则可以根据 MOE 软件模拟分子对接结果将肽链拆分表达。



4.1.2 目标蛋白分离制备与质量检查

将构建好的含有目标蛋白基因的质粒转化到 BL21(DE3)感受态细胞中，从转化的平板中挑选单克隆，接种到 4 mL 的 LB 培养基中，分别置于 15℃、37℃ 诱导表达。根据目标蛋白条带是否清晰判断是否成功构建表达载体。将目标蛋白表达菌株放大至 3L 培养，收集菌体。采用 Ni-IDA 亲和层析纯化目标蛋白。目标蛋白质检实验操作流程参考《蛋白质电泳实验技术》（郭尧君，科学出版社，1999）

4.1.3 目标蛋白与 DA 的亲合力测定

采用生物膜干涉技术（BLI）Fortbio Octet® 系统测定 DA 与目标蛋白的互作亲和性，可委托相关专业检测机构完成实验检测。

4.2 靶标器官/组织的确证

4.2.1 昆虫中毒症状与组织病理研究

（1）DA 处理昆虫的中毒症状观察

用点滴法、饲喂法或注射法分别将不同剂量的 DA 处理 5-10 头 B 型烟粉虱或家蚕的幼虫与成虫，设置 3-4 次重复和对照，每隔一定时间观察记录供试昆虫中毒症状变化，统计死亡率。

（2）处理昆虫的组织病理研究

取上述方法 DA 处理后的昆虫，取整虫体或进行解剖，分离它们脂肪体、消化道、体壁、神经系统及血淋巴等器官/组织，进行固定、包埋后，切片观察，借助光学与电子显微镜观察比较家蚕不同器官组织因 DA 中引起的组织病理变化。参照本课题组的方法（Xia J, Huang Z, Hu Q. *Advances in Entomology*, 2013, 1(2):15-19）进行实验。

4.2.2 不同器官/组织中 DA 的分布规律

取上述方法 DA 处理后的昆虫，进行解剖，分离它们脂肪体、消化道、体壁、神经系统及血淋巴等器官/组织，分别提取 DA，参照 Hubert *et al.* (1999)（Hubert M, Cherton J-C, Vey A, Lange C. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1999, 13, 179-184）的方法检测 DA 在不同组织器官中的含量。烟粉虱体型太小，此部分可省略，结合家蚕中的研究结果，在 4.3.1 高亲和蛋白的分布研究中利用原位杂交技术验证烟粉虱中 DA 的靶标器官/组织。



4.3 靶标蛋白的鉴定

4.3.1 高亲和蛋白的器官/组织分布与亚细胞定位

分布：取上述方法 DA 处理后的昆虫，进行解剖，分离它们血淋巴、脂肪体、消化道、体壁及神经系统等器官/组织，采用荧光定量 PCR（qPCR）法测定 DA 高亲和蛋白基因的组织器官表达特点（参照叶棋浓，现代分子生物学技术及实验技巧（电子书），化学工业出版社，2015）。或者利用 DA 高亲和蛋白的单克隆抗体，采用原位杂交方法研究 DA 高亲和蛋白的亚细胞定位，与对照比较分析 DA 处理细胞后对蛋白定位的影响。参照《蛋白质相互作用及亚细胞定位原理与技术》（龚燕华和彭小忠，中国协和医科大学出版社，2010）。

亚细胞定位：以不同剂量的 DA 处理家蚕 Bm12 细胞，一定时间后，采用原位杂交方法研究 DA 高亲和蛋白的亚细胞定位。

4.3.2 高亲和蛋白与 DA 活性的关系

采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术与 RNAi 技术敲除家蚕与 B 型烟粉虱的 DA 高亲和蛋白基因，然后用不同剂量的 DA 处理供试家蚕，考察昆虫的中毒症状与死亡率变化，对比研究沉默高亲和蛋白基因的昆虫中毒症状与死亡率差异。（参考 Wei *et al.* Heritable genome editing with CRISPR/Cas9 in the silkworm, *Bombyx mori*. *Plos One*, 2014, 9 (7), DOI: 10.1371/journal.pone.0101210; Zhang *et al.* RNAi knock-down of the *Bemisia tabaci* Toll gene (BtToll) increases mortality after challenge with destruxin A. *Mol immunol*, 2017, 88:164-173)。

4.3.3 DA 对高亲和蛋白互作功能的影响

从 STRING, BioGrid, IntAct 与 MINT 等蛋白互作数据库搜索目标蛋白的互作蛋白，采用昆虫双杂交法（insect two-hybrid, I2H）研究供试蛋白互作功能变化与 DA 的剂量关系，参照 Mon *et al.* (Mon H, Sugahara R, Hong SM, Lee JM, Kamachi Y, Kawaguchi Y, Kusakabe T. *Analytical Biochem*, 2009, 392: 180-182); 利用 Gateway 系统构建 I2H 载体，Synergy™ H1 (BioTek, Winooski, VT, USA) 系统检测共转染细胞的荧光变化。利用双分子荧光互补（bimolecular fluorescence complementation, BiFC）或 I2H 进行结果验证。对比研究 DA 对高亲和蛋白互作功能的影响。参考《现代分子生物学技术及实验技巧（电子书）》（叶棋浓，化学工业出版社，2015）。



4.4 靶标蛋白与 DA 的结合模式研究

4.4.1 靶标蛋白基因点突变对与 DA 亲和性的影响

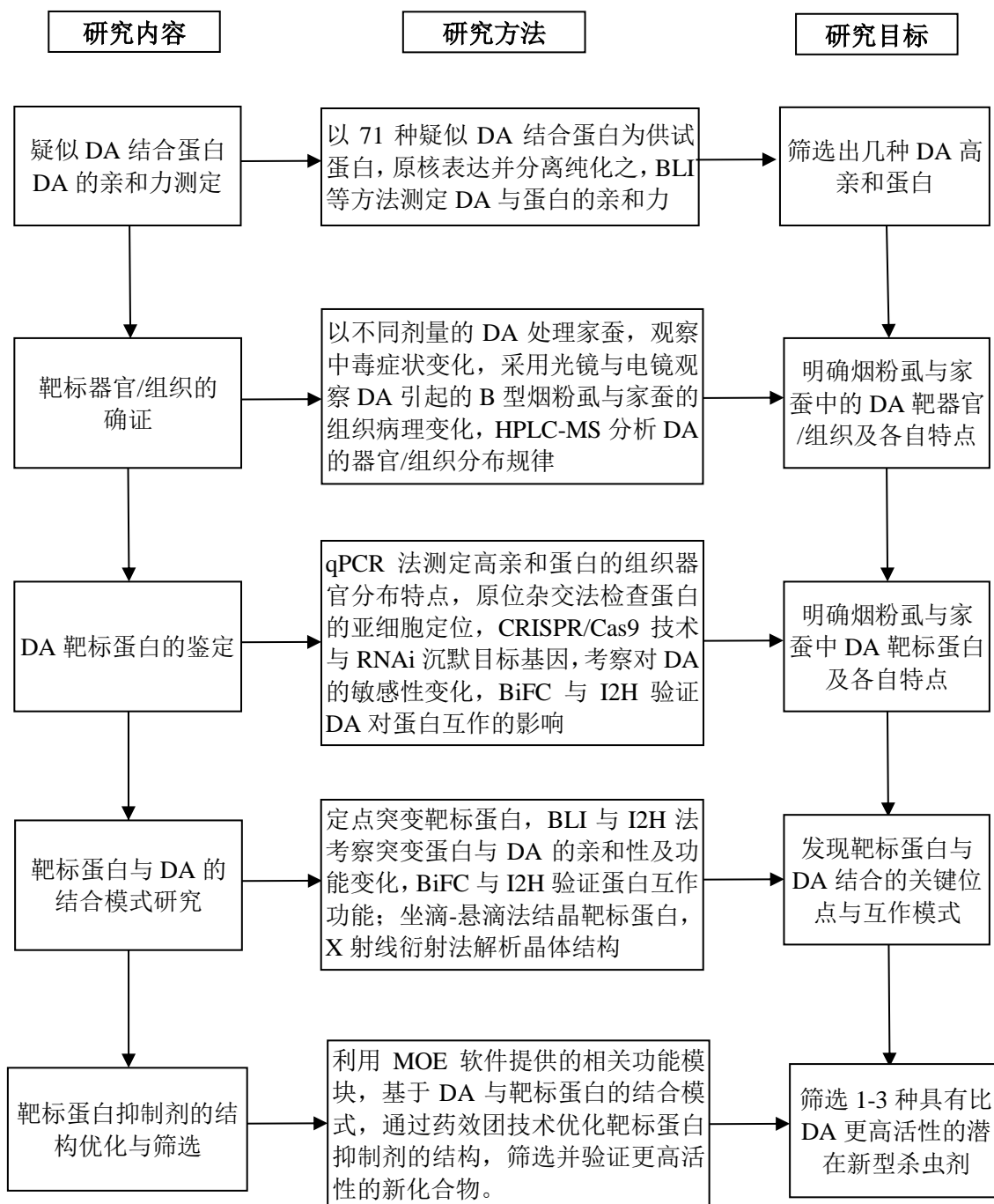
在靶标蛋白基因序列基础上, 根据 MOE2014 软件模拟 DA 与蛋白的结合模式, 改变结合位点关键氨基酸的碱基密码, 合成目标蛋白突变基因序列, 再通过 BLI 法体外测定 DA 与突变蛋白的亲和性 (见 4.1.3), 通过 I2H 及 BiFC 技术测定与验证 DA 对突变蛋白互作功能的影响 (见 4.3.2)。参考《医学分子生物学实验技术 (第 3 版/研究生)》(药立波, 人民卫生出版社, 2014)。

4.4.2 DA 靶标蛋白的结晶与 3D 结构研究

纯化得到大量高纯度的 DA 靶标蛋白 ($\geq 10 \text{ mg/mL}$), 采用坐滴法进行结晶条件的筛选, 然后用悬滴法对结晶条件进行优化, 培养得到具有强衍射能力的晶体, 收集 X 射线衍射数据并进行处理和分析, 根据晶体性质, 解析晶体结构, 建立 DA 靶标蛋白的三维结构模型。参考《生物大分子的 X 射线晶体学》(柯衡明, 陈玉祥, 蔡继文: 化学工业出版社, 2010)。如果蛋白结晶与结构解析的难度太大, 可考虑委托相关专业机构完成。

4.5 靶标蛋白抑制剂的结构优化与筛选

利用 MOE 软件提供的化学定量构效关系 (QSAR)、高通量筛选 (HTS) 数据分析和组合化学应用的功能模块, 基于 DA 与靶标蛋白的结合模式, 通过药效团技术优化靶标蛋白抑制剂的结构, 通过上述 4.3.3 方法筛选并验证更高活性的新化合物。



技术路线图

5 研究难点、风险与解决措施

我们在研究目标的确定，研究内容与研究方案的选择，以及研究材料与研究技术积累等方面开展了扎实的前期工作，总体上，本项目研究工作不存在克服不了的难点，且风险是可控的。



风险与回避：本项目的风险在于有可能漏筛 DA 靶标蛋白，我们认为这种可能性不大，因为，一是筛查面很大，有 71 个候选蛋白；二是候选蛋白经由挑选，这些蛋白在 5 个处理中重复性较好，至少是重复 2 次以上的蛋白，并且是与 DA 分子模拟对接得分较高的蛋白；三是筛选与验证方法是有效的，候选蛋白要经过一系列分析和验证研究，才被确定为 DA 靶标蛋白。退一步，就算在筛选过程中未发现 DA 高亲和性蛋白，则可根据已有的亲和力蛋白与 DA 的模拟对接数据，扩大筛查范围。所以项目的风险已被控制在最小范围内。

难点及其解决措施：由于对 DA 作用的靶标器官/组织尚未明确，因此确定 DA 的靶标蛋白有一定难度。本项目拟同时开展靶标器官/组织研究与 DA 亲和蛋白研究，在明确靶标器官/组织的基础上，综合分析 DA 与蛋白的亲合性及其器官/组织分布与中毒症状等信息，并通过组织病理学、生物膜光干涉（BLI）等物理方法与双杂交或双分子荧光法测定 DA 与蛋白的互作关系、以及蛋白结晶与 X 射线衍射分析 DA 与蛋白的互作模式，各种分析方法相互验证，将可最终明确 DA 的靶标蛋白。

6 年度研究计划及预期研究结果

6.1 年度研究计划

2020.1-2020.12：开展供试蛋白与 DA 的亲和力研究；开展靶标器官/组织确证的研究工作。基本明确 DA 作用的靶标器官/组织。

2021.1-2021.12：完成供试蛋白与 DA 的亲和力研究；完成靶标器官/组织的确证；开展靶标蛋白的鉴定研究；开展靶标蛋白与 DA 结合模式的研究。明确 DA 作用的靶标器官/组织，基本明确 DA 的靶标蛋白及其结合模式。

2022.1-2022.12：完成靶标蛋白的鉴定研究；完成靶标蛋白与 DA 结合模式的研究；开展靶标蛋白抑制剂的结构优化与筛选研究。明确 DA 的靶标蛋白及其结合模式，合成多个结构优化的对靶标蛋白活性增强的新型分子。

2023.1-2023.12：完成全部研究工作，筛选出 1-3 个对靶标蛋白具有较强活性的新型分子。提交结题报告。



6.2 预期研究结果

发表论文 7-9 篇，其中 SCI 论文 6-8 篇；申报发明专利 1-2 项；培养研究生 4-6 名；邀请 2-3 人次国际上本领域专家来华学术交流，派出 4-6 人次参加国际学术会议。

7 项目组成员及其分工

项目组由 10 人组成，其中高级职称 3 人，中级 1 人，研究生 6 人。分工如下：

编号	姓名	性别	职称	学位	项目分工	每年工作时间（月）
1	胡琼波	男	教授	博士	项目总负责	8
2	翁群芳	女	副研究员	博士	DA作用的靶组织/器官	5
3	周琢强	男	副教授	博士	靶标蛋白抑制剂结构优化与筛选	5
4	易辉玉	女	讲师	博士	靶标蛋白鉴定	6
5	王菁菁	女	博士生	硕士	靶标蛋白的鉴定	11
6	尹飞	女	博士生	硕士	靶标器官/组织的确证	11
7	彭海涛	男	硕士生	学士	靶标蛋白与DA的结合模式研究	11
8	牛小燕	女	硕士生	学士	靶标蛋白抑制剂的优化与筛选	11
9	肖苗苗	女	硕士生	学士	靶标蛋白与DA的结合模式研究	11
10	关雪	女	硕士生	学士	DA靶标蛋白确证	11



国家自然科学基金资助项目签批审核表

<p>我接受国家自然科学基金的资助，将按照申请书、项目批准意见和计划书负责实施本项目（批准号：U1901205），严格遵守国家自然科学基金委员会关于资助项目管理、财务等各项规定，切实保证研究工作时间，认真开展研究工作，按时报送有关材料，及时报告重大情况变动，对资助项目发表的论著和取得的研究成果按规定进行标注。</p> <p>项目负责人（签章）： 年 月 日</p>		<p>我单位同意承担上述国家自然科学基金项目，将保证项目负责人及其研究队伍的稳定和研究项目实施所需的条件，严格遵守国家自然科学基金委员会有关资助项目管理、财务等各项规定，并督促实施。</p> <p>依托单位（公章） 年 月 日</p>					
本栏目由基金委填写	<p>科学处审查意见：</p>						
	<p>建议年度拨款计划（本栏目为自动生成，单位：万元）：</p>						
	年度	总额	第一年	第二年	第三年	第四年	第五年
	金额						
本栏目主要用于重大项目等	<p>科学部审查意见：</p> <p>负责人（签章）： 年 月 日</p>						
	<p>相关局室审核意见：</p> <p>负责人（签章）： 年 月 日</p>						
		<p>委领导审批意见：</p> <p>委领导（签章）： 年 月 日</p>					

二、科研项目

2. 主参

2.2 “蜕皮激素调控去乙酰酶 Rpd3 参与细胞自噬的分子机制”

国家自然科学基金委员会资助项目计划书



项目批准号	31970463
申请代码	C040603
归口管理部门	
依托单位代码	51064208A0499-0932



国家自然科学基金委员会 资助项目计划书

资助类别：面上项目

亚类说明：

附注说明：

项目名称：蜕皮激素调控去乙酰酶Rpd3参与细胞自噬的分子机制

直接费用：61万元 执行年限：2020.01-2023.12

负责人：田铃

通讯地址：广东省广州市天河区五山路483号华南农业大学动科楼235室

邮政编码：510642 电 话：020-85284735

电子邮件：tianling@scau.edu.cn

依托单位：华南农业大学

联系人：倪慧群 电 话：020-85280070

填表日期：2019年08月21日

国家自然科学基金委员会制



国家自然科学基金委员会资助项目计划书填报说明

- 一、项目负责人收到《关于国家自然科学基金资助项目批准及有关事项的通知》（以下简称《批准通知》）后，请认真阅读本填报说明，参照国家自然科学基金相关项目管理办法及《国家自然科学基金资助项目资金管理办法》（请查阅国家自然科学基金委员会官方网站首页“政策法规”栏目），按《批准通知》的要求认真填写和提交《国家自然科学基金委员会资助项目计划书》（以下简称《计划书》）。
- 二、填写《计划书》时要求科学严谨、实事求是、表述清晰、准确。《计划书》经国家自然科学基金委员会相关项目管理部门审核批准后，将作为项目研究计划执行和检查、验收的依据。
- 三、《计划书》各部分填写要求如下：
 - （一）简表：由系统自动生成。
 - （二）摘要及关键词：各类获资助项目都必须填写中、英文摘要及关键词。
 - （三）项目组主要成员：计划书中列出姓名的项目组主要成员由系统自动生成，与申请书原成员保持一致，不可随意调整。如果批准通知中“项目评审意见及修改意见表”中“对研究方案的修改意见”栏目有调整项目组成员相关要求的，待项目开始执行后，按照项目成员变更程序另行办理。
 - （四）资金预算表：根据批准资助的直接费用，按照《国家自然科学基金项目预算表编制说明》填报资金预算表和预算说明书。国家重大科研仪器研制项目、重大项目还应按照预算评审后批复的直接费用各科目金额填报资金预算表、预算说明书及相应的预算明细表。
 - （五）正文：
 1. 面上项目、青年科学基金项目、地区科学基金项目：如果《批准通知》中没有修改要求的，只需选择“研究内容和研究目标按照申请书执行”即可；如果《批准通知》中“项目评审意见及修改意见表”中“对研究方案的修改意见”栏目明确要求调整研究期限和研究内容等的，须选择“根据研究方案修改意见更改”并填报相关修改内容。
 2. 重点项目、重点国际（地区）合作研究项目、重大项目、国家重大科研仪器研制项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，根据《批准通知》的要求填写研究（研制）内容，不得自行降低、更改研究目标（或仪器研制的技术性能与主要技术指标以及验收技术指标）或缩减研究（研制）内容。此外，还要突出以下几点：
 - （1）研究的难点和在实施过程中可能遇到的问题（或仪器研制风险），拟采用的研究（研制）方案和技术路线；
 - （2）项目主要参与者分工，合作研究单位之间的关系与分工，重大项目还需说明课题之间的关联；
 - （3）详细的年度研究（研制）计划。



3. 国家杰出青年科学基金、优秀青年科学基金和海外及港澳学者合作研究基金项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，按下列提纲撰写：
 - (1) 研究方向；
 - (2) 结合国内外研究现状，说明研究工作的学术思想和科学意义（限两个页面）；
 - (3) 研究内容、研究方案及预期目标（限两个页面）；
 - (4) 年度研究计划；
 - (5) 研究队伍的组成情况。
4. 国家自然科学基金基础科学中心项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，应当根据评审委员会和现场考察专家组的意见和建议，进一步完善并细化研究计划，作为评估和验收的依据。按下列提纲撰写：
 - (1) 五年拟开展的研究工作（包括主要研究方向、关键科学问题与研究内容）；
 - (2) 研究方案（包括骨干成员之间的分工及合作方式、学科交叉融合研究计划等）；
 - (3) 年度研究计划；
 - (4) 五年预期目标和可能取得的重大突破等；
 - (5) 研究队伍的组成情况。
5. 对于其他类型项目，参照面上项目的方式进行选择和填写。



简表

申请者信息	姓 名	田 铃	性 别	女	出生年月	1980年02月	民 族	满族
	学 位	博士			职称	教授		
	是否在站博士后	否			电子邮件	tianling@scau.edu.cn		
	电 话	020-85284735			个人网页			
	工 作 单 位	华南农业大学						
	所 在 院 系 所	动物科学学院						
依托单位信息	名 称	华南农业大学					代码	51064208A0499
	联 系 人	倪慧群			电子邮件	kyc.jhk@scau.edu.cn		
	电 话	020-85280070			网站地址	http://kjc.scau.edu.cn/		
合作单位信息	单 位 名 称							
项目基本信息	项 目 名 称	蜕皮激素调控去乙酰酶Rpd3参与细胞自噬的分子机制						
	资 助 类 别	面上项目				亚 类 说 明		
	附 注 说 明							
	申 请 代 码	C040603:昆虫生理生化与毒理						
	基 地 类 别							
	执 行 年 限	2020.01-2023.12						
	直 接 费 用	61万元						



项目摘要

中文摘要:

细胞自噬在生物的生长发育和疾病发生中具有重要作用,乙酰化修饰被报道参与调控细胞自噬的发生。申请人前期研究发现:家蚕自噬(ATG)蛋白发生去乙酰化修饰后出核,并诱导自噬;Rpd3为调控ATG蛋白出核的关键去乙酰酶。然而,酵母和哺乳动物中Rpd3同源蛋白相反地调控细胞自噬的发生,具体差异机制不详。申请人进一步检测发现,蜕皮激素(20E)信号诱导家蚕Rpd3的转录及其蛋白出核;Rpd3基因过表达诱导大部分Atg基因的表达和自噬发生。据此,本项目拟利用免疫沉淀结合蛋白质谱技术鉴定家蚕Rpd3存在的翻译后修饰方式和位点,解析该修饰方式和位点对Rpd3亚细胞定位和细胞自噬的影响;利用蛋白组学鉴定受Rpd3修饰、参与调控自噬发生的关键因子并进行功能验证,从而解析20E调控Rpd3参与调控细胞自噬的分子机制。本研究有利于阐释进化尺度中间物种的昆虫细胞自噬发生的分子机制,为高等动物的相关研究提供借鉴与参考。

Abstract:

Autophagy is essential for development and pivotal in disease occurrence in eukaryon. Acetylation on autophagy related (ATG) protein is reported to regulate autophagy occurrence. Previous work of the applicant showed that acetylation of ATG proteins facilitated their nuclear exportation and thus autophagy in *Bombyx mori*; moreover, deacetylase Rpd3 was revealed to be the key enzyme in regulating the translocation of ATG proteins. In addition, the molting hormone (20-hydroxyecdysone, 20E) signaling induced the transcription of Rpd3 and its nuclear exportation. However, the homologs of Rpd3 oppositely mediate autophagy in yeast and mammals, that the detailed different mechanism is unclear. The applicant further found that overexpression of Rpd3 induced most of all Atg genes expression and the occurrence of autophagy. Therefore, in this project, immunoprecipitation associated with mass-spectrum will be used to identify the post-translation modification types and sites of *B. mori* Rpd3, which would be verified for their roles in the subcellular localization of Rpd3 and autophagy. Proteomics will be performed to identify the key Rpd3-deacetylated and interacted factors involved in the regulation of autophagy, for illustrating the mechanism underlying autophagy manipulated by 20E-regulated Rpd3. These researches will not only help to illustrate the molecular mechanism of autophagy during the species from intermediate evolutionary-scale such as insects, but also provide references for studies of autophagy in higher animals.

关键词(用分号分开): 激素; 发育与变态; 去乙酰酶; 细胞自噬; 分子机制

Keywords(用分号分开): Hormone; Development and metamorphosis; Deacetylase; Autophagy; Molecular mechanism



项目组主要成员

编号	姓名	出生年月	性别	职称	学位	单位名称	电话	证件号码	项目分工	每年工作时间（月）				
1	田铃	1980.02	女	教授	博士	华南农业大学	020-85284735	21032319800217428X	项目负责人	6				
2	易辉玉	1981.11	女	讲师	博士	华南农业大学	020-85284735	430422198111071765	转基因家蚕品系的构建	3				
3	吴文梅	1991.01	男	博士生	硕士	华南农业大学	020-85284735	340826199101030396	20E对Rpd3的PTM调控	8				
4	徐静	1993.05	女	博士生	硕士	华南农业大学	020-85284735	131082199305120763	Rpd3作用及结合蛋白的鉴定	8				
5	王玉洁	1991.03	女	硕士生	学士	华南农业大学	020-85284735	411402199103306129	20E对rpd3的转录调控	7				
6	戴易晨	1994.04	男	硕士生	学士	华南农业大学	020-85284735	340121199404044939	Rpd3对Atg基因的转录调控	7				
7	李暑燕	1995.06	女	硕士生	学士	华南农业大学	020-85284735	41030519950607154X	Rpd3调控Atg的关键因子的解析	7				
8	徐仙颖	1995.06	女	硕士生	学士	华南农业大学	020-85284735	460022199506110018	转基因家蚕的构建	7				
总人数			高级		中级		初级		博士后		博士生		硕士生	
8			1		1						2		4	



国家自然科学基金项目直接费用预算表（定额补助）

项目批准号：31970463

项目负责人：田铃

金额单位：万元

序号	科目名称	金额
1	项目直接费用合计	61.0000
2	1、设备费	4.0000
3	(1)设备购置费	4.0000
4	(2)设备试制费	0.00
5	(3)设备升级改造与租赁费	0.00
6	2、材料费	17.0000
7	3、测试化验加工费	15.0000
8	4、燃料动力费	0.00
9	5、差旅/会议/国际合作与交流费	5.5000
10	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	4.5000
11	7、劳务费	15.0000
12	8、专家咨询费	0.00
13	9、其他支出	0.00



预算说明书（定额补助）

（请按照《国家自然科学基金项目预算表编制说明》等的有关要求，对各项支出的主要用途和测算理由，以及合作研究外拨资金、单价 ≥ 10 万元的设备费等内容进行必要说明。）

直接经费合计：61.0 万元。

1. 设备购置费：4.00 万元

用于更新购买移液器等小型设备使用。

2. 材料费：17.00 万元

（1）购买标签、泛-翻译后修饰一抗、二抗抗体及免疫共沉淀相关试剂等共 **5.00 万元**；
（2）购买细胞培养基、血清、转染试剂等共 **5.00 万元**；（3）购买限制性内切酶、PCR 酶等分子生物学试剂共 **3.00 万元**；（4）购买常规试剂、耗材等共 **4.00 万元**。

3. 测试化验加工费：15.00 万元

（1）蛋白组学鉴定 **6.00 万元**；（2）透射电镜观察 **2.00 万元**；（3）Confocal 显微镜观察 **2.00 万元**；（4）DNA 测序 **2.50 万元**；（5）引物合成 **2.50 万元**。

4. 燃料动力费：无。

5. 差旅/会议/国际合作与交流费：5.50 万元

（1）参加国内相关会议，约 0.50 万元/次，5 人次，共 **2.50 万元**；（2）参加国外相关会议，约 1.50 万元/次，2 人次，共 **3.00 万元**。

6. 出版/文献/信息传播/知识产权事务费：4.50 万元

项目预计发表 SCI 论文 3—6 篇以及中文核心期刊论文多篇，版面费共计 3.50 万元；文献检索费为 0.50 万；科研书籍购买费为 0.50 万元。

7. 劳务费：15.00 万元

4 名硕士生 4 年每人每年工作 7 个月，劳务费为 500 元/人/月 $\times 112=5.6$ 万元；2 名博士生 4 年每年 8 个月，劳务费为 1000 元/人/月 $\times 64=6.40$ 万元；家蚕饲养临时用工 1 人，4 年每年 5 个月，劳务费为 1500 元/人/月 $\times 20=3.00$ 万元。

8. 专家咨询费：无。

9. 其他支出：无。

项目负责人签字：

科研部门公章：

财务部门公章：



报告正文

研究内容和研究目标按照申请书执行。



国家自然科学基金资助项目签批审核表

<p>我接受国家自然科学基金的资助，将按照申请书、项目批准意见和计划书负责实施本项目（批准号：31970463），严格遵守国家自然科学基金委员会关于资助项目管理、财务等各项规定，切实保证研究工作时间，认真开展研究工作，按时报送有关材料，及时报告重大情况变动，对资助项目发表的论著和取得的研究成果按规定进行标注。</p> <p>项目负责人（签章）： 年 月 日</p>		<p>我单位同意承担上述国家自然科学基金项目，将保证项目负责人及其研究队伍的稳定和研究项目实施所需的条件，严格遵守国家自然科学基金委员会有关资助项目管理、财务等各项规定，并督促实施。</p> <p>依托单位（公章） 年 月 日</p>					
本栏目由基金委填写	<p>科学处审查意见：</p>						
	<p>建议年度拨款计划（本栏目为自动生成，单位：万元）：</p>						
	年度	总额	第一年	第二年	第三年	第四年	第五年
	金额						
本栏目主要用于重大项目等	<p>科学部审查意见：</p> <p>负责人（签章）： 年 月 日</p>						
	<p>相关局室审核意见：</p> <p>负责人（签章）： 年 月 日</p>						
		<p>委领导审批意见：</p> <p>委领导（签章）： 年 月 日</p>					

二、科研项目

2. 主要参加的项目

2.3 “**BmNPV** 通过病毒蛋白结合 **ATG8** 与细胞自噬发生互作 的研究”项目任务书

受理编号: c22140500002142

项目编号: 2022A1515012639

文件编号: 粤基金字(2022)3号

广东省基础与应用基础研究基金项目 任务书

项目名称: BmNPV通过病毒蛋白结合ATG8与细胞自噬发生互作研究

项目类别: 广东省自然科学基金-面上项目

项目起止时间: 2022-01-01 至 2024-12-31

管理单位(甲方): 广东省基础与应用基础研究基金委员会

依托单位(乙方): 华南农业大学

通讯地址: 广东省广州市天河区五山路483号

邮政编码: 510642

单位电话: 020-85283435

项目负责人: 邓小娟

联系电话: 020-85280547



(广东科技微信公众号)



(查看任务书信息)



(受理纸质材料二维码)

广东省基础与应用基础研究
基金委员会
二〇二〇年制

填写说明

一、项目任务书内容原则上要求与申报书相关内容保持一致，不得无故修改。

二、项目承担单位通过广东省科技业务管理阳光政务平台下载项目任务书，按要求完成签名盖章后提交至省科技厅受理窗口。

三、签名盖章说明。请分别在单位工作分工及经费分配情况页、人员信息页、签约各方页等地方按要求签字或盖章，签章不合规或错漏将不予受理。其中，人员信息页要求所有参与人员本人亲笔签名，代签或印章无效，漏签将不予受理。

四、本任务书自签字并加盖公章之日起生效，各方均应负本任务书的法律责任，不应受机构、人事变动影响。

2022A1515012639

一、主要研究内容和要达到的目标

家蚕核型多角体病是由核型多角体病毒（BmNPV）引起的血液型脓病，是蚕业生产上最为严重的病害，其发生率占蚕病的60%以上。因此，解析BmNPV的入侵、感染和增殖机制是蚕业科学家需要解决的重要课题。但BmNPV与家蚕宿主之间的关系复杂，目前多数研究集中BmNPV的抗性机制和抗性品种的选育。近年来随着自噬研究的深入，发现自噬不仅是降解细胞内聚集的蛋白质和受损的细胞器，还可以清除病原微生物，抑制病毒的复制和繁殖，成为昆虫抵抗病原的一个重要组成部分。但自噬并不总是能抵抗病毒，病毒在长期进化的过程中，可能演化出逃避自噬的分子机制，甚至利用宿主的自噬增强自己的复制和繁殖。

已有的研究表明BmNPV感染家蚕细胞，能引发BmN细胞发生自噬；随着感染进程的发生，细胞自噬水平下降；利用自噬抑制剂或RNAi下调宿主的自噬水平，病毒的增殖减少，表明病毒可以逃逸宿主的自噬并且利用自噬促进自身增殖。但病毒逃逸自噬的分子机制尚未解析，本项目从病毒蛋白与自噬相关蛋白互作的角度出发，以鉴定BmNPV感染引发的自噬进程中与ATG8互作的病毒蛋白为目标，研究BmNPV与家蚕在自噬中的互作关系，项目主要研究内容如下：（1）通过免疫共沉淀和质谱分析，鉴定可能与ATG8相互作用的病毒蛋白，进一步对获得的病毒蛋白进行LIR结构域的预测，筛查与ATG8结合的病毒蛋白。本部分内容已经基本完成，获得了结构糖蛋白p40等候选病毒蛋白为下一步的研究目标。（2）通过CoIP、荧光共定位和膜蛋白酵母双杂交技术验证候选病毒蛋白与ATG8的互作；（3）利用ET同源重组技术和Bac-to-Bac系统构建敲除型、补回型重组病毒，检测候选病毒蛋白的缺失和LIR基序突变后与ATG8的共定位情况，验证病毒蛋白与ATG8的结合；（4）分析病毒蛋白与ATG8互作对宿主自噬和病毒增殖能力的影响。

通过上述研究，本项目将达到以下研究目标：（1）获得与BmNPV中与家蚕ATG8互作的蛋白1-2个；（2）阐明病毒蛋白与ATG8的互作对宿主自噬水平和病毒增殖的影响；（3）揭示BmNPV与家蚕在细胞自噬中的相互关系，加深对家蚕对BmNPV免疫机制的理解。本项目的研究可为筛选抗BmNPV药物的新靶标和培育家蚕抗性品种奠定理论基础；同时，将丰富“杆状病毒-鳞翅目昆虫”相互关系的生物学基础研究，为昆虫杆状病毒在鳞翅目害虫生物防治上的应用提供参考。

二、项目预期获得的研究成果及形式

论文及专著情况	国家统计源刊物以上刊物 发表论文（篇）		3		科技报告（篇）		1	
	其中被SCI/EI/ISTP收录 论文数（篇）		2		培养人才（人）		3	
	专著（册）		0		引进人才（人）		0	
专利情况(项)	发明专利		实用新型专利		外观设计专利		国外专利	
	申请	授权	申请	授权	申请	授权	申请	授权
	1	0	0	0	0	0	0	0

三、项目进度和阶段目标

(一) 项目起止时间: 2022-01-01 至 2024-12-31		
(二) 项目实施进度及阶段主要目标:		
开始日期	结束日期	主要工作内容
2022-01-01	2022-12-31	<p>(1) 将p40等候选病毒蛋白编码基因与Flag标签融合, 克隆至pIEx-4真核表达载体, 转染稳定表达GFP-ATG8的BmN细胞, 通过CoIP、荧光共定位、膜蛋白酵母双杂交系统检测候选病毒蛋白与家蚕ATG8的互作。</p> <p>(2) 进一步对病毒蛋白进行LIR基序(W/F/YxxI/L/V)的点突变与互作分析, 验证候选蛋白与ATG8的互作, 确定病毒蛋白与ATG8结合的位点。</p> <p>(3) 提交年度执行报告。</p>
2023-01-01	2023-12-31	<p>(1) 通过ET同源重组技术和Bac-to-Bac系统构建候选蛋白敲除型、补回型的重组病毒, 检测候选蛋白LIR基序的点突变、缺失突变和野生型等不同补回的重组病毒感染BmN细胞中病毒蛋白与ATG8的共定位情况, 验证互作关系。</p> <p>(2) 提交年度执行报告。</p>
2024-01-01	2024-12-31	<p>(1) 进一步检测不同重组病毒感染的BmN细胞中, 宿主自噬水平及子代病毒的增殖情况, 分析候选蛋白与ATG8的互作缺失对宿主细胞自噬和病毒增殖的影响。</p> <p>(2) 参加重要的昆虫学术会议或自噬大会, 进行学术报告与交流。</p> <p>(3) 提交结题报告。</p>

四、项目总经费及省基金委经费预算

1. 省基金委经费下达总额：（大写）壹拾万圆整；（小写）10万元；					
2. 省基金委经费年度下达计划：					
年度	2022 年	年	年	年	年
经费(万元)	10.00				
3. 总经费及省基金委经费开支预算计划：					
经费筹集情况：					(单位：万元)
省基金委经费	自筹资金				合计
	自有资金	贷款	地方政府投入	其它	
10.00	0.00	0.00	0.00	0.00	10.00
政府部门、境外资金及其他资金投入情况说明：					
与本项目相关的其他经费来源			(单位：万元)		
其他计划资助经费：			0.00		
单位配套经费：			0.00		
其他经费资助：			0.00		
其他经费来源合计：					

五、人员信息

项目负责人

姓名	证件号码	年龄	性别	职称	学历	在项目中承担的任务	所在单位	签名
邓小娟	330825197307132729	49	女	副教授	博士研究生	项目负责人	华南农业大学	

项目组主要成员

姓名	证件号码	年龄	性别	职称	学历	在项目中承担的任务	所在单位	签名
易辉玉	430422198111071765	41	女	讲师	博士研究生	病毒蛋白与ATG8的互作分析	华南农业大学	
王禹生	411522199312026618	29	男	未取得	本科	病毒蛋白的突变与真核表达载体的构建	华南农业大学	
梁宽	450102199709221015	25	男	未取得	本科	敲除型、补回型重组病毒的构建与互作验证	华南农业大学	
黄浩贤	440681199802162030	24	男	未取得	本科	病毒增殖与自噬水平检测	华南农业大学	

六、工作分工及经费分配

承担/参与单位名称 (盖章)	工作分工	总经费分摊 (万元)	省基金委经费分配 (万元)
华南农业大学	本项目由华南农业大学独立完成。	10.00	10.00
	合计	10.00	10.00

七、任务书条款

第一条 甲方与乙方根据《中华人民共和国民法典》及国家有关法规和规定，按照《广东省科学技术厅关于广东省基础与应用基础研究基金（省自然科学基金、联合基金等）项目管理的实施细则（试行）》《广东省省级科技计划项目验收结题工作规程（试行）》等规定，为顺利完成（2022）年BmNPV通过病毒蛋白结合ATG8与细胞自噬发生互作的研究专项项目（文件编号：粤基金字（2022）3号）经协商一致，特订立本任务书，作为甲乙双方在项目实施管理过程中共同遵守的依据。

第二条 甲方的权利义务：

1. 按任务书规定进行经费核拨的有关工作协调。
2. 根据甲方需要，在不影响乙方工作的前提下，定期或不定期对乙方项目的实施情况和经费使用情况进行检查或抽查。
3. 根据《广东省科研诚信管理办法(试行)》等规定对乙方进行科技计划信用管理。

第三条 乙方的权利义务：

1. 确保落实自筹经费及有关保障条件。
2. 按任务书规定，对甲方核拨的经费实行专款专用，单独列账，并随时配合甲方进行监督检查。
3. 经费使用按照广东省级财政科研项目经费使用等有关规定进行管理。
4. 项目依托单位应制定经费使用“负面清单+包干制”内部管理制度并报甲方备案。
5. 使用财政资金采购设备、原材料等，按照《广东省实施〈中华人民共和国招标投标法〉办法》有关规定，符合招标条件的须进行招标。
6. 项目任务书任务完成后，或任务书规定的任务、指标及经费投入等提前完成的，乙方可提出验收结题申请，并按甲方要求做好项目验收结题工作。
7. 若项目发生需要终止结题的情况，乙方须提出终止结题申请，并按甲方要求做好项目终止结题工作。
8. 在每年规定时间内向甲方如实提交上年度工作情况报告，报告内容包含上年度项目进展情况、经费决算和取得的成果等。
9. 按照国家和省有关规定，提交科技报告及其他材料。
10. 利用甲方的经费获得的研究成果，项目负责人和参与者应当注明获得“广东省基础与应用基础研究基金（英文：Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation）（项目编号）”资助或作有关说明。
11. 乙方要恪守科学道德准则，遵守科研活动规范，践行科研诚信要求，不得抄袭、剽窃他人科研成果或者伪造、篡改研究数据、研究结论；不得购买、代写、代投论文，虚构同行评议专家及评议意见；不得违反论文署名规范，擅自标注或虚假标注获得科技计划（专项、基金等）等资助；不得弄虚作假，骗取科技计划（专项、基金等）项目、科研经费以及奖励、荣誉等；不得有其他违背科研诚信要求的行为。
12. 确保本项目开展的研究工作符合我国科技伦理管理相关规定。

第四条 在履行本任务书的过程中，如出现广东省相关政策法规重大改变等不可抗力情况，甲方有权对所核拨经费的数量和时间进行相应调整。

第五条 在履行本任务书的过程中，当事人一方发现可能导致项目整体或部分失败的情形时，应及时通知另一方，并采取适当措施减少损失，没有及时通知并采取适当措施，致使损失扩大的，应当就扩大的损失承担责任。

第六条 本项目技术成果的归属、转让和实施技术成果所产生的经济利益的分享，除双方另有约定外，按国家和广东省有关法规执行。

第七条 根据项目具体情况，经双方另行协商订立的附加条款，作为本任务书正式内容的一部分，与本任务书具有同等效力。

第八条 本任务书一式三份，各份具有同等效力。甲、乙方及项目负责人各执一份，三方签字、盖章后即生效，有效期至项目结题后一年内。各方均应负任务书的法律责任，不应受机构、人事变动的影响。

第九条 乙方必须接受甲方聘请的本项目任务书监理单位的监督和管理。监理单位按照甲方赋予的权利对本项目任务书的履行进行审核、进度调查，对项目任务书变更、经费使用情况进行监督管理及组织项目验收。

说明：1. 本任务书中，凡是当事人约定无需填写的内容，应在空白处划（/）。

2. 委托代理人签订本任务书的，应出具合法、有效的委托书。

八、本任务书签约各方

管理单位（甲方）：

广东省基础与应用基础研究基金委员会（盖章）



法定代表人（或法人代理）：

曾路

（签章）

2022 年 04 月 19 日

依托单位（乙方）：华南农业大学

（盖章）

法定代表人（或法人代理）：刘雅红

（签章）

联系人（项目主管）姓名：倪慧群

（签章）

Email: kjcgxk@scau.edu.cn

电话：020-85283435 / 15920301530

开户单位名称：华南农业大学

开户银行名称：广东广州工行五山支行

开户银行帐号：3602002609000310520

年 月 日

联系人（项目负责人）姓名：邓小娟

（签名）

Email: dengxj@scau.edu.cn

电话：020-85280547

年 月 日

二、科研项目

2. 主参

2.4 “桔类等绿色智慧种养提质增效技术示范与推广”下达通知

广东省科学技术厅文件

粤科农字〔2024〕200号

广东省科学技术厅关于下达“百千万工程” 农村科技特派员第二轮重点派驻人员 名单和任务清单的通知

各有关地市科技局，各农村科技特派员派出单位：

为深入贯彻落实省委关于实施“百县千镇万村高质量发展工程”有关决策部署，进一步推动农村科技特派员下乡助力城乡区域协调发展，按照《广东省农村科技特派员科技助力百县千镇万村高质量发展行动计划（2023-2026）》《广东省科学技术厅关于落实“百千万工程”开展新一轮农村科技特派员重点派驻任务（2024-2026年）选派管理工作的通知》要求，在首轮农村科技特派员3年帮扶重点派驻任务即将到期的情况下，按照“镇村

发榜+地市组织选派+省级认定支持”的新型组织管理方式，第二轮共选派 2960 名农村科技特派员组建 984 个团队，“一对一”结对科技帮扶全省涉农县（市、区）辖内 984 个乡镇。现将“百千万工程”农村科技特派员第二轮重点派驻人员名单和任务清单印发给你们：

一、各地市科技管理部门、派出单位应按照《广东省科学技术厅关于落实“百千万工程”开展新一轮农村科技特派员重点派驻任务（2024-2026 年）选派管理工作的通知》（粤科函农字〔2023〕1649 号）、《广东省科学技术厅关于印发〈农村科技特派员助力“百千万工程”管理工作指引（2024-2026 年）〉的通知》（粤科函农字〔2024〕192 号）有关要求，做好本辖区、本单位农村科技特派员组织、管理、考核和验收相关工作。

二、各农村科技特派员团队应聚焦落实省委实施“百千万工程”决策部署，在省、市科技管理部门指导下，扎根基层一线，配合驻镇帮扶工作队开展科技帮扶工作，农村科技特派员团队纳入驻镇帮扶工作队（乡镇人民政府）统一管理，本轮帮扶任务周期为 3 年。

三、农村科技特派员承担重点派驻任务经费保障，按年度以科技支撑“百千万工程”专项资金下达到各地市，各地市科技管理部门要加强管理，压实责任，专款专用，提高资金使用效率，应将专项资金拨付到相关派出单位，用于开展科技帮扶工作。

附件：“百千万工程”农村科技特派员第二轮重点派驻人员
名单和任务清单



（联系人及电话：赵清泉，020-83163909）

附件

“百千万工程”农村科技特派员第二轮重点派驻人员名单和任务清单

序号	编号	帮扶镇（乡）	派出单位	团队成员	任务名称
一、汕头市					
1	KTP20240001	潮南区两英镇	汕头市乡村振兴发展中心	陈梓敏、杨伟权、郑秋枫	麻叶的种植与加工技术研究及示范推广
2	KTP20240002	潮南区司马浦镇	广东省农业科学院（负责人、成员2）、汕头市农业科学研究所（成员1）	董博、张建林、黄丹	农田综合利用与乡镇景观关键技术示范推广
3	KTP20240003	潮南区陈店镇	广东开放大学（负责人、成员2）、汕头职业技术学院（成员1）	王紫虹、刘毅嘉、罗学强	乡镇特色产业电商综合服务示范与推广
4	KTP20240004	潮南区胪岗镇	汕头市农业科学研究所	汤昌兴、张秀珊、王玉	粮油花卉等作物新品种及栽培技术研究及示范推广
5	KTP20240005	潮南区仙城镇	仲恺农业工程学院（负责人）、汕头市农业科学研究所（成员1、成员2）	陈青春、王兴才、王文举	鲜食玉米、水稻等作物高效周年轮作模式推广
6	KTP20240006	潮南区成田镇	广东省农业科学院（负责人、成员2）、汕头市农业科学研究所（成员1）	闫晋强、郭英铎、蔡金森	“成甜”牌水果玉米周年生产技术支撑
7	KTP20240007	潮南区陇田镇	仲恺农业工程学院（负责人、成员2）、汕头市白沙蔬菜原种研究所（成员1）	樊丽娜、郭商羿、齐永文	甘薯、玉米产业提质增效技术示范推广

678	KTP20240678	四会市龙甫镇	广州理工学院（负责人）、广东亚视演艺职业学院（成员1）、广东创新科技职业学院（成员2）	赖家恩、陈晓莹、阙砚	龙甫镇龙头村古村落生态保护及新文旅形象设计
679	KTP20240679	四会市下茆镇	佛山大学（负责人）、华南农业大学（成员1、成员2）	叶菲、严炳辉、成兰仙	家禽养殖技术和农业物联网技术的研究与推广应用
680	KTP20240680	四会市江谷镇	华南农业大学	张灵枝、魏京广、曾桂香	茶叶与鱼虾养殖提质增效技术支撑服务
681	KTP20240681	四会市地豆镇	广东省农业科学院（负责人、成员2）、华南师范大学（成员1）	秦红杰、鲍锬山、郭文磊	南药高品质种植技术推广与应用示范
682	KTP20240682	四会市黄田镇	华南农业大学	田铃、易辉玉、郭长飞	桔类等绿色智慧种养提质增效技术示范与推广
683	KTP20240683	四会市迳口镇	中国水产科学研究院珠江水产研究所	刘晓莉、李伟、陈海港	水产动物高效繁育技术示范及应用推广
684	KTP20240684	四会市罗源镇	肇庆学院	陈聪、郭丽英、杨凤梅	竹稻、木瓜、红薯等作物栽培与古树病虫害防治技术指导
685	KTP20240685	四会市威整镇	肇庆市农林科学院（负责人）、广东省农业科学院（成员1）、广东轻工职业技术大学（成员2）	李霜霜、赵东、黄小波	农作物、花卉、水厂养殖技术指导、培训及新品种引进与栽培技术示范
686	KTP20240686	广宁县排沙镇	肇庆市农林科学院	赵苗菲、陈水莲、谭瑞坤	油茶、林下经济种植和管理技术支撑与服务
687	KTP20240687	广宁县坑口镇	仲恺农业工程学院（负责人、成员1）、广东省实验动物监测所（成员2）	华姝姝、张丽、余露军	坑口镇竹下种植技术提升与品牌建设服务
688	KTP20240688	广宁县北市镇	广东金融学院（负责人、成员1）、广东省农业科学院（成员2）	潘星容、谭永石、吕复兵	科技多元化赋能乡村振兴示范与推广
689	KTP20240689	广宁县江屯镇	广东省农业科学院（负责人、成员2）、肇庆市农林科学院（成员1）	阮灼豪、韩东苗、尹鹏	优化水产高效健康养殖技术助力江屯镇生态农业发展

公开方式：依申请公开

抄送：省“百千万工程”指挥部办公室，省农业农村厅。

广东省科学技术厅办公室

2024年9月5日印发

三、论文、著作等

1. 检索证明

1.1 以第一作者发表本专业论文检索证明

SCAU LIB202519419

检索证明

根据委托人提供的论文材料，委托人华南农业大学动物科学学院 易辉玉 1 篇论文收录情况如下表。

序号	论文名称	发表刊物及发表的年月卷期/页码等	作者排名	论文等级	作者文中单位	收录情况	影响因子	中科院大类分区
1	BmCalpains are involved in autophagy and apoptosis during metamorphosis and after starvation in Bombyx mori	Insect Science 出版年: 2018 卷期: 25 页码: 379-388 文献号: 文献类型: Article	第一作者	B 类	华南农业大学 动物科学学院	SCI	IF2-year=2.71 IF5-year=2.546 (2018)	生物 3 区 Top 期刊: 否 (2018)

说明: 论文等级和中科院大类分区按《华南农业大学学术论文集评价方案(试行)》划分

报告免责声明: 如未盖章, 报告无效



三、论文、著作等

1. 检索证明

1.2 以通讯作者发表本专业论文检索证明

SCAULIB202519420

检索证明

根据委托人提供的论文材料，委托人华南农业大学动物科学学院 易辉玉 1 篇论文收录情况如下表。

序号	论文名称	发表刊物及发表的年月卷期/页码等	作者排名	论文等级	作者文中单位	收录情况	影响因子	中科院大类分区
1	Clathrin-dependent endocytosis predominantly mediates protein absorption by fat body from the hemolymph in Bombyx mori	Insect Science 出版年: 2020 卷期: 27 4 页码: 675-686 文献号: 文献类型: Article	共同通讯作者, 倒数第二	T2 类	华南农业大学 动物科学学院	SCI	IF2-year=3.262 IF5-year=3.206 (2020)	农林科学 1 区 Top 期刊: 是 (2020)

说明: 论文等级和中科院大类分区按《华南农业大学学术论文评价方案(试行)》划分。

报告免责声明: 如未盖章, 报告无效



三、论文、著作等

2. 以第一作者发表本专业论文情况

2.1 **BmCalpains are involved in autophagy and apoptosis during metamorphosis and after starvation in *Bombyx mori***

Insect Science

Editor-in-Chief:
Le Kang



WILEY

www.wileyonlinelibrary.com/journal/ins

Insect science

Contents

Original articles

- 356 Prediction of effective RNA interference targets and pathway-related genes in lepidopteran insects by RNA sequencing analysis
R. B. Guan, H. C. Li and X. X. Miao
- 368 Sialotranscriptome sequencing and analysis of *Anopheles sinensis* and comparison with *Psorophora albipes* sialotranscriptome (Diptera: Culicidae)
Y. J. Fang, Z. T. Yan and B. Chen
- 379 BmCalpains are involved in autophagy and apoptosis during metamorphosis and after starvation in *Bombyx mori*
H. Y. Yi, W. Y. Yang, W. M. Wu, X. X. Li, X. J. Deng, Q. R. Li, Y. Cao, Y. J. Zhong and Y. D. Huang
- 389 Molecular elements of pheromone detection in the female moth, *Heliothis virescens*
M. Zielonka, H. Breer and J. Krieger
- 401 Induction of P450 genes in *Nilaparvata lugens* and *Sogatella furcifera* by two neonicotinoid insecticides
Y. X. Yang, N. Yu, J. H. Zhang, Y. X. Zhang and Z. W. Liu
- 409 Effects of temperature on fitness costs in chlorpyrifos-resistant brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)
B. J. Yang, M. L. Liu, Y. X. Zhang and Z. W. Liu
- 418 Functional analysis of the circadian clock gene *timeless* in *Tribolium castaneum*
C. J. Li, X. P. Yun, X. J. Yu and B. Li
- 429 The long-term immunological effects of alloferon and its analogues in the mealworm *Tenebrio molitor*
E. Czarniewska, A. Urbański, S. Chowański and M. Kuczer
- 439 Gene expression profiles of the Southern house mosquito *Culex quinquefasciatus* during exposure to permethrin
W. R. Reid, L. Zhang, Y. Gong, T. Li and N. Liu
- 454 Fungal infection dynamics in response to temperature in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*
V. Y. Kryukov, O. N. Yaroslavtseva, M. M. A. Whitten, M. V. Tyurin, K. J. Ficken, C. Greig, N. R. Melo, V. V. Glupov, I. M. Dubovskiy and T. M. Butt
- 467 Phenotypic variation in food utilization in an outbreak insect herbivore
R. Quezada-García, Á. Fuentealba and É. Bauce
- 475 Agroecological management of a soil-dwelling orthopteran pest in vineyards
J. A. Nboyine, S. Boyer, D. J. Saville and S. D. Wratten
- 487 Heterogeneous activity causes a nonlinear increase in the group energy use of ant workers isolated from queen and brood
N. Ferral, K. Holloway, M. Z. Li, Z. Z. Yin and C. Hou
- 499 How do groups of red imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae) feed on a droplet of sugar water?
C. Wang, X. Chen, L. M. Hooper-Bùi, R. Strecker, Y. Z. Wen, W. Q. Qin, T. Ma, Z. H. Sun, X. Y. Chen and X. J. Wen
- 508 UV reflectance is associated with environmental conditions in Palaearctic *Pieris napi* (Lepidoptera: Pieridae)
D. Stella, P. Pecháček, V. B. Meyer-Rochow and K. Kleisner
- 519 Diversity and biogeography of a species-rich ant fauna of the Australian seasonal tropics
A. N. Andersen, B. D. Hoffmann and S. Oberprieler

WILEY

CN 11-6019/Q

ISSN 1672-9609



ORIGINAL ARTICLE

BmCalpains are involved in autophagy and apoptosis during metamorphosis and after starvation in *Bombyx mori*

Hui-Yu Yi^{1,2}, Wan-Ying Yang¹, Wen-Mei Wu¹, Xing-Xia Li¹, Xiao-Juan Deng¹, Qing-Rong Li³, Yang Cao¹, Yang-Jin Zhong¹ and Ya-Dong Huang²

¹Guangdong Provincial Key Laboratory of Agro-animal Genomics and Molecular Breeding/Guangdong Provincial Sericulture and Mulberry Engineering Research Center, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou, China; ²College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou, China and ³The Sericultural and Agri-Food Research Institute of the Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, China

Abstract Apoptosis and autophagy play crucial roles during *Bombyx mori* metamorphosis and in response to various adverse conditions, including starvation. Recently, calpain, one of the major intracellular proteases, has been reported to be involved in apoptosis and autophagy in mammals. BmATG5 and BmATG6 have been identified to mediate apoptosis following autophagy induced by 20-hydroxyecdysone and starvation in *B. mori*. However, *B. mori* calpains and their functions remain unclear. In this study, phylogenetic analysis of calpains from *B. mori*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* were performed and the results showed distinct close relationships of BmCalpain-A/B with DmCalpain-A/B, BmCalpain-C with DmCalpain-C, and BmCalpain-7 with HsCalpain-7. Then, the expression profiles of *BmCalpains* were analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction, and results showed that expression of *BmCalpain-A/B*, *BmCalpain-C* and *BmCalpain-7* was significantly increased during *B. mori* metamorphosis and induced in the fat body and midgut of starved larvae, which is consistent with the expression profiles of *BmAtg5*, *BmAtg6* and *BmCaspase-1*. Moreover, the apoptosis-associated cleavage of BmATG6 in Bm-12 cells was significantly enhanced when *BmCalpain-A/B* and *BmCalpain-7* were induced by starvation, and was partially inhibited by the inhibitor of either calpain or caspase, but completely inhibited when both types of inhibitors were applied together. Our results indicated that BmCalpains, including BmCalpain-A/B, -C and -7, may be involved in autophagy and apoptosis during *B. mori* metamorphosis and after starvation, and may also contribute to the apoptosis-associated cleavage of BmATG6.

Key words apoptosis; autophagy; BmATG6; *Bombyx mori*; calpain; starvation

Correspondence: Yang-Jin Zhong, Guangdong Provincial Key Laboratory of Agro-animal Genomics and Molecular Breeding/Guangdong Provincial Sericulture and Mulberry Engineering Research Center, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China. Tel/Fax: +86 20 85281010; email: zhongyj@scau.edu.cn. Ya-Dong Huang, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China. Tel/Fax: +86 20 85222600; email: tydhuang@jnu.edu.cn.

Introduction

Apoptosis and autophagy are two forms of physiological and conserved programmed cell death and play very important roles in development and host defense in multicellular organisms (Maiuri *et al.*, 2007; Gozuacik & Kimchi, 2007; Mizushima *et al.*, 2008). In the last two decades, the crosslink between autophagy and apoptosis has been studied. In mammals, autophagy-related proteins, ATG4D, ATG5 and BECN1 (ATG6), have been demonstrated to trigger apoptosis when cleaved to

N63ATG4D (47 kDa), tATG5 (24 kDa) and ATG6-C (35 kDa or 37 kDa), respectively, and these cleavages are accomplished by two kinds of cysteine proteases, caspases and calpains (Yousefi *et al.*, 2006; Betin & Lane, 2006; Djavaheri-Mergny *et al.*, 2010; Wirawan *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2011). Cleavage of ATG4 and ATG6 are mediated by caspases (Betin & Lane, 2009; Wirawan *et al.*, 2010) while calpains cleave ATG5 (Yousefi *et al.*, 2006). Caspases and calpains are hence considered as important regulators in mediating the interconnection between autophagy and apoptosis. As key drivers in apoptosis and regulators in autophagy and autophagy-apoptosis crosslink, caspases have been well studied (Nuñez *et al.*, 1998; Riedl & Shi, 2004; Yu *et al.*, 2004; Oral *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2014). Calpains, a family of well-conserved and calcium-dependent neutral cysteine proteases, also play important diverse roles in many physiological processes, including apoptosis and autophagy (Demarchi *et al.*, 2006; Croall & Ersfeld, 2007; Cheng *et al.*, 2008; Ono & Sorimachi, 2012; Smith & Schnellmann, 2012).

So far, calpains have been identified in prokaryotes and nearly all eukaryotes including *Drosophila melanogaster* (Theopold *et al.*, 1995; Jekely & Friedrich, 1999; Goll *et al.*, 2003; Spadoni *et al.*, 2003; Park & Emori, 2008; Rawlings, 2015), but most studies were performed in mammals, especially for *Homo sapiens* calpains. *H. sapiens* calpain system includes 14 large subunits, two small subunits and one endogenous inhibitor (calpastain) (Croall & Ersfeld, 2007; Ono & Sorimachi, 2012; Smith & Schnellmann, 2012). Human calpain-1 and calpain-2 are two well-studied classical calpains containing catalytic protease domain (CysPc), C2-like domain (C2L) and penta-EF-hand domain (PEF). They exist as heterodimers by binding to small subunits and are inhibited by calpastain. Calpains (calpain-5, -6, -7, -10 and -15) without PEF or/and C2L domains are referred to as non-classical calpains. The conserved CysPc core domain is composed of PC1 and PC2 domains and contains cysteine-asparagine-histidine (C-N-H) catalytic triad.

As a holometabolous invertebrate, silkworm *Bombyx mori* has become a model for studying autophagy and apoptosis. During metamorphosis, autophagy and apoptosis have been found in the fat body, midgut and silk gland (Li *et al.*, 2010; Sumithra *et al.*, 2010; Franzetti *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2012, 2013). Moreover, two autophagy-related proteins, BmATG5 and BmATG6, were confirmed to play crucial roles in autophagy and inducing apoptosis following autophagy (Xie *et al.*, 2016). So far, only caspases have been identified in *B. mori* (Zhang *et al.*, 2010), and there has been no report about BmCalpains and their functions. In this study, we performed phylogenetic analysis of calpains from *B. mori*, *D. melanogaster*

and *H. sapiens*, and then investigated the expression profiles of BmCalpains during *B. mori* metamorphosis and after starvation in the fat body and midgut of larvae and Bm-12 cells. In addition, we also examined the effects of BmCalpains on cleavage of BmATG6. Our results indicated that BmCalpains may be involved in the process of autophagy and apoptosis in *B. mori* and in mediating the apoptosis-associated cleavage of BmATG6.

Materials and methods

Insects and cells

Larvae of *B. mori* (strain Dazao) were provided by Guangdong Sericulture Technology Promotion Center and fed mulberry leaves at 25°C with 70% relative humidity. DZNU-Bm-12 cells (abbreviated as Bm-12) were kindly provided by professor Chuan-xi Zhang, Zhejiang University, and cultured in TNM-FH medium (Hyclone, Logan, UT, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Hyclone) at 27°C.

Sequence analysis

Calpain sequences were obtained from a National Center of Biotechnology Information (NCBI) search. Sequence alignments were completed using online software Align (<http://vega.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>) (Pearson *et al.*, 1997), and multiple sequence alignments were performed using ClustalW software. A phylogenetic tree of calpains from some species was constructed by MEGA 7.0 software using the Neighbor-Joining method (Kumar *et al.*, 2016).

Tissue collection

To determine expression levels of BmCalpains during *B. mori* metamorphosis, fat body was collected from day 3 fifth-instar larvae (5L3d) to day 1 pupae (P1). To determine induced expression profiles of BmCalpains under starvation, fifth-instar larvae were not fed from day 3 and fat body and midgut were collected after starvation for 0, 12, 24 and 48 h. Samples were frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Amino acid starvation of Bm-12 cells

The Bm-12 cells in a mid-log phase were washed twice with filtered insect balanced salt solution (IBSS, 75 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂, 55 mmol/L KCl,

2.6 mmol/L MgCl₂, 2.8 mmol/L MgSO₄, 4.2 mmol/L NaHCO₃, 7.5 mmol/L NaH₂PO₄, pH 6.4) and then starved by replacing medium with IBSS. At 0, 6, 12, 24, 36, 48 and 72 h after starvation, cells were collected for the following analysis.

Quantitative real-time PCR analysis

Total RNAs were extracted using RNAiso Plus Reagent (TaKaRa, Otsu, Japan). The first strand complementary DNA (cDNA) was synthesized using the PrimeScriptTM RT reagent kit with genomic DNA Eraser (TaKaRa) following the manufacturer's instructions. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed using SsoFastTM EvaGreen[®] Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in a CFX96 machine (Bio-Rad). *BmTubulin* was used as a reference control and primers are listed in supplementary Table S1. Data from three replicates of each sample were analyzed using a comparative method ($2^{-\Delta\Delta CT}$) and these experiments were repeated with three different biological samples. Figures were made with GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, CA, USA) with one representative set of data. Significance of difference was determined by an unpaired *t*-test or by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's multiple comparison test using the same software (GraphPad).

Trypan blue staining

After washing with phosphate-buffered saline (PBS: 0.1 mol/L, pH 7.0), Bm-12 cells were stained with 0.4% trypan blue (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 3 min at 25°C. Cells were observed under an LSM510 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) at 20× and 40× magnifications.

LysoTracker staining

Bm-12 cells were stained with 50 nmol/L LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 10 min at 37°C. After washing with PBS three times, cells were observed under a LSM510 confocal microscope (Zeiss) at 40× magnification.

Hoechst staining

Bm-12 cells were stained with 10 μg/mL Hoechst 33258 dye (Beyotime Co. Ltd., Shanghai, China) for 5 min at 37°C. After washing with PBS three times, cells

were observed under an AMF4302 fluorescence microscope (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA) at 40× magnification.

Actinomycin D (AD) treatment of Bm-12 cells

Bm-12 cells in a mid-log phase were divided into six groups and cultured in fresh medium or medium containing AD (Sigma-Aldrich), AD plus MDL 28170 (N-benzyloxycarbonyl-Val-Phe-aldehyde) (Enzo Life Science, Farmingdale, NY, USA), AD plus Z-VAD-fmk (Sigma-Aldrich), AD plus MDL 28170 and Z-VAD-fmk, or AD plus 3-MA (Sigma-Aldrich, USA). The final concentration of AD was 1 μg/mL, while MDL 28170, Z-VAD-fmk and 3-MA were used at final concentrations of 20, 20 and 10 μmol/L, respectively. After incubation for 12 h, cells were collected for Western blotting analysis.

Western blotting

Total protein concentration of each sample was measured and adjusted to the same. The primary antibody against BmATG6 (1 : 500) and monoclonal antibody against tubulin (1 : 10 000; Beyotime) were used (Xie *et al.*, 2016). Western blotting signal was developed by using Western Lightning ECL (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

Results

Sequence analysis of *B. mori* calpains

Based on the conserved CysPc domain of calpains, eight predicted *B. mori* calpains and isoforms were reported in NCBI, including BmCalpain-A1, BmCalpain-A2, BmCalpain-B3, BmCalpain-B4, BmCalpain-C, BmCalpain-7, BmCalpain-11 and BmCalpain-D. Phylogenetic analysis of calpains from *B. mori*, *D. melanogaster* and *H. sapiens* (Fig. 1) revealed distinct close relationships of BmCalpain-A and BmCalpain-B with DmCalpain-A and DmCalpain-B, BmCalpain-C with DmCalpain-C, BmCalpain-7 with HsCalpain-7. However, BmCalpain-11 and BmCalpain-D formed separate branches. BmCalpain-A and -B belonged to the classical group but BmCalpain-C, -7, -11 and -D belonged to the non-classical group. Four isoforms of BmCalpain-A and -B, containing the same CysPc, C2L and PEF domains, are highly identical (Fig. S1) and grouped together as BmCalpain-A/B. Alignment of CysPc domains from BmCalpains and their homologs (Figs. S2 and S3) showed that

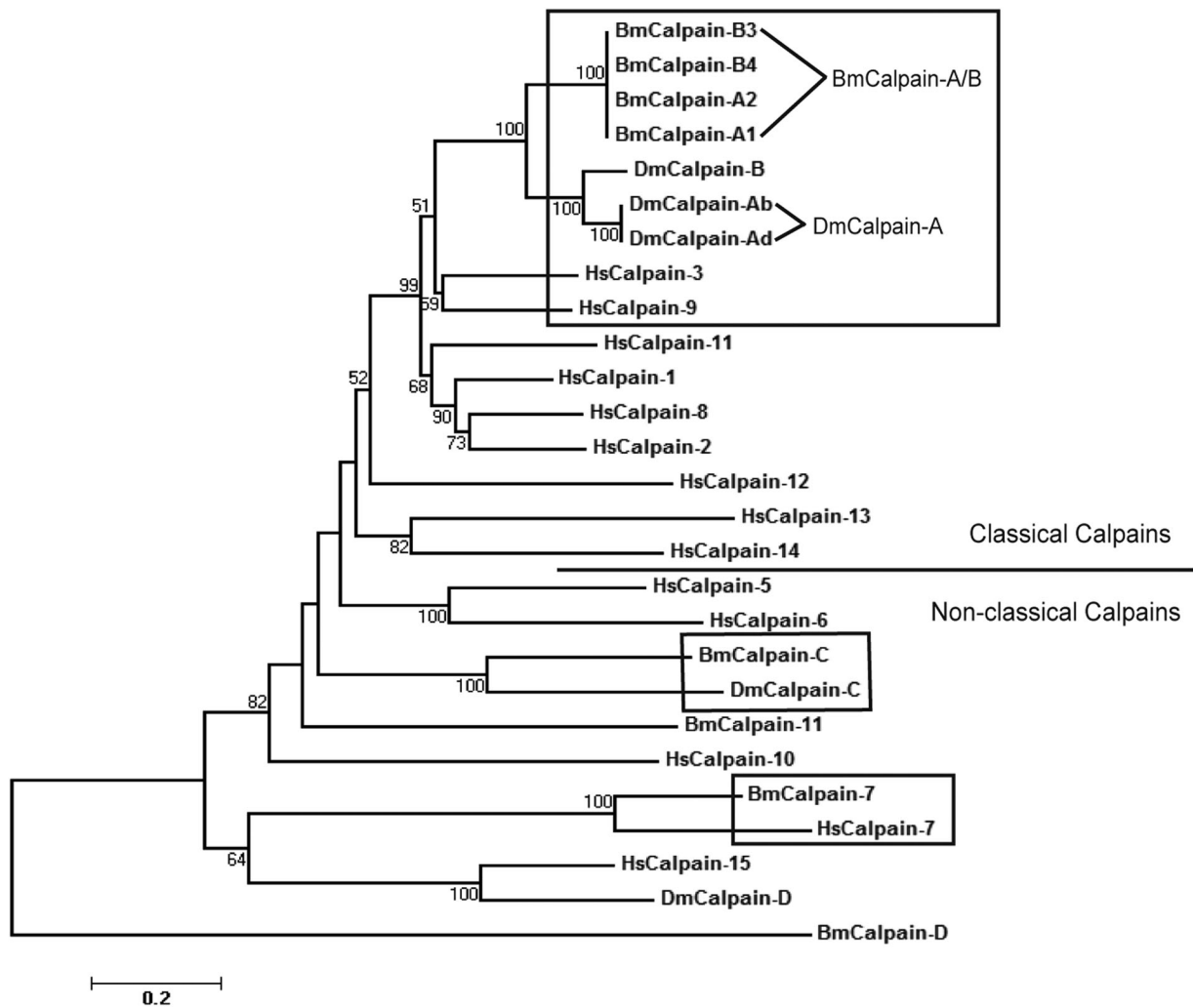


Fig. 1 Phylogenetic analysis of BmCalpains, DmCalpains and HsCalpains. The phylogenetic tree was constructed by the MEGA7.0 software using the Neighbor-Joining method. Only values more than 50% are indicated. Sequence accession numbers of BmCalpains, DmCalpains and HsCalpains are indicated in Table S2. Frames indicated BmCalpain-A/B, -C, -7 and their homologs from *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*.

BmCalpain-A/B and -7 contain standard catalytic sites 'C-N-H', BmCalpain-C and -11 have mutated catalytic sites, and BmCalpain-D lacks the PC2 domain. In this study, we focused on BmCalpain-A/B, -C and -7, and their sequences have been confirmed by DNA sequencing.

Expression profiles of BmCalpains during larva-pupa metamorphosis

Autophagy and apoptosis intensely occur in the fat body during *B. mori* metamorphosis, and are characterized by increasing expression of autophagy-related genes

including *BmAtg5* and *BmAtg6* and a typical apoptosis-related gene *BmCaspase-1* (Tian *et al.*, 2012, 2013). BmATG5 and BmATG6 serve as mediators for autophagy-triggered apoptosis and may be cleaved by BmCalpains (Xie *et al.*, 2016). To determine the expression profiles of *BmCalpains* and their relationships with autophagy and apoptosis, expression of *BmCalpains*, *BmAtg5*, *BmAtg6* and *BmCaspase-1* in the fat body during *B. mori* larva-pupa metamorphosis was analyzed (Fig. 2). Expression of *BmAtg5*, *BmAtg6* and *BmCaspase-1* was significantly increased during pupation, which is consistent with the results previously reported (Tian *et al.*, 2012, 2013). Expression of *BmCalpain-A/B*, *BmCalpain-C*

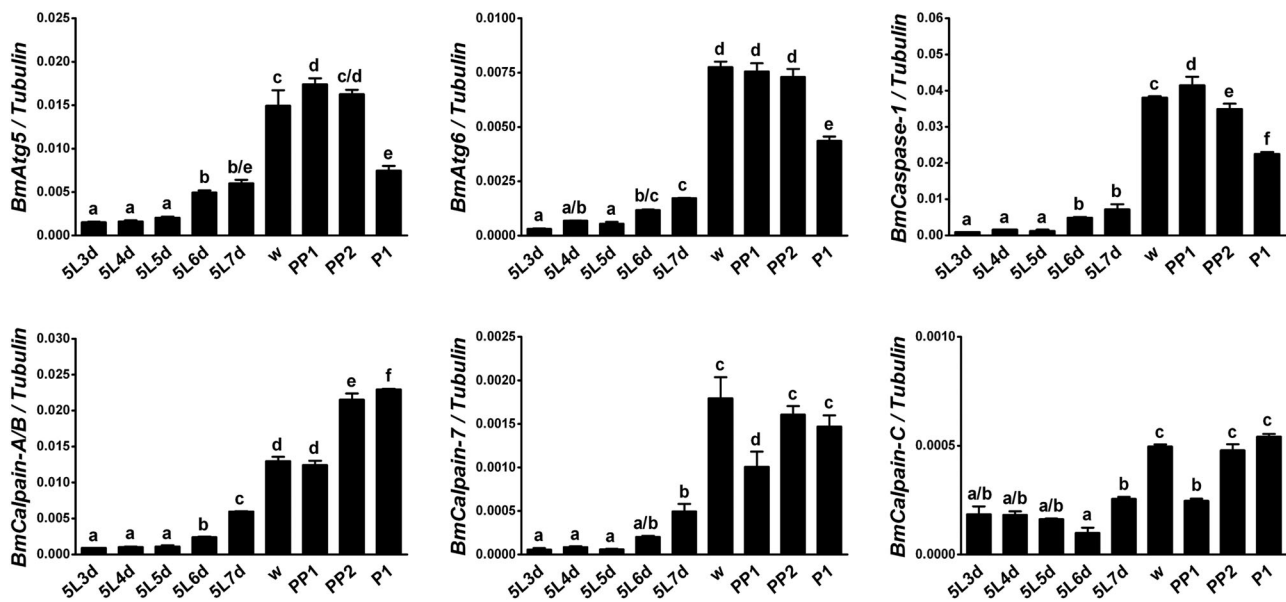


Fig. 2 Expression profiles of *BmCalpains* in the fat body during larva-pupa metamorphosis. Corresponding to autophagy-related genes (*BmAtg5* and *BmAtg6*) and apoptosis-related gene (*BmCaspase-1*), expression of *BmCalpain-A/B*, *-C* and *-7* was increased in fat body during pupation. Identical letters indicate no significant difference ($P > 0.05$), while different letters indicate significant difference ($P < 0.05$) among different times. 5L3d, day 3 of fifth instar *B. mori* larvae; W, the wandering stage larvae; PP1, day 1 of the prepupal stage; P1, day 1 of pupae.

and *BmCalpain-7* was also significantly increased at the wandering stage, with the expression profiles similar to *BmAtg5*, *BmAtg6* and *BmCaspase-1*. Moreover, expression of all *BmCalpains* maintained at high levels, while expression of *BmAtg5*, *BmAtg6* and *BmCaspase-1* decreased when entering the pupal stage.

Expression profiles of *BmCalpains* triggered by starvation

Both autophagy and apoptosis can be triggered by starvation. Therefore, induced expression of *BmCalpains* was investigated in the fat body and midgut after *B. mori* larvae were starved. Expression of *BmAtg5*, *BmAtg6* and *BmCaspase-1* was significantly induced in both fat body and midgut after larvae were starved for 12 h (Fig. 3), suggesting that autophagy and apoptosis were induced by starvation in silkworm larvae. Corresponding to the expression profiles of *BmAtg5*, *BmAtg6* and *BmCaspase-1*, expression of *BmCalpain-A/B*, *BmCalpain-C* and *BmCalpain-7* was significantly induced. Expression of *BmCalpain-A/B* and *BmCalpain-C* was significantly induced after starvation for 24 h while *BmCalpain-7* was induced after 12 h starvation in both fat body and midgut, which is similar to *BmAtg6* expression (Fig. 3). Expression of *BmCalpain-A/B*, *BmCalpain-C* and *BmCalpain-7*

continued to increase in the midgut with prolonged starvation (Fig. 3B), which is consistent with expression of *BmAtg5*, *BmAtg6* and *BmCaspase-1*, but expression of *BmCalpain-A/B*, *BmCalpain-C* and *BmCalpain-7* reached a peak at 24 h after starvation in the fat body (Fig. 3A).

Induction of *BmCalpains* by starvation and inhibition of *BmATG6* cleavage by calpain and caspase inhibitors in the Bm-12 cells

Amino acid starvation is commonly used to induce both autophagy and apoptosis *in vitro* (Martinet *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2012). Functions of *BmATG5* and *BmATG6* in autophagy-triggered apoptosis have been demonstrated in Bm-12 cells (Xie *et al.*, 2016). Therefore, we first investigated expression of *BmCalpains* in Bm-12 cells after starvation with IBSS. First, staining results (Fig. 4) showed that the numbers of cells stained with trypan blue (to detect cell death) (Fig. 4A), LysoTracker Red (to detect autophagolysosome) (Fig. 4B), and Hoechst (to detect chromatic condensation) (Fig. 4C) were all increased in starved cells, indicating that cell death, autophagy and apoptosis were induced by amino acid starvation in the Bm-12 cells. Blue-stained dead cells, red-stained autophagolysosome and Hoechst-stained chromatic condensation were gradually increased after

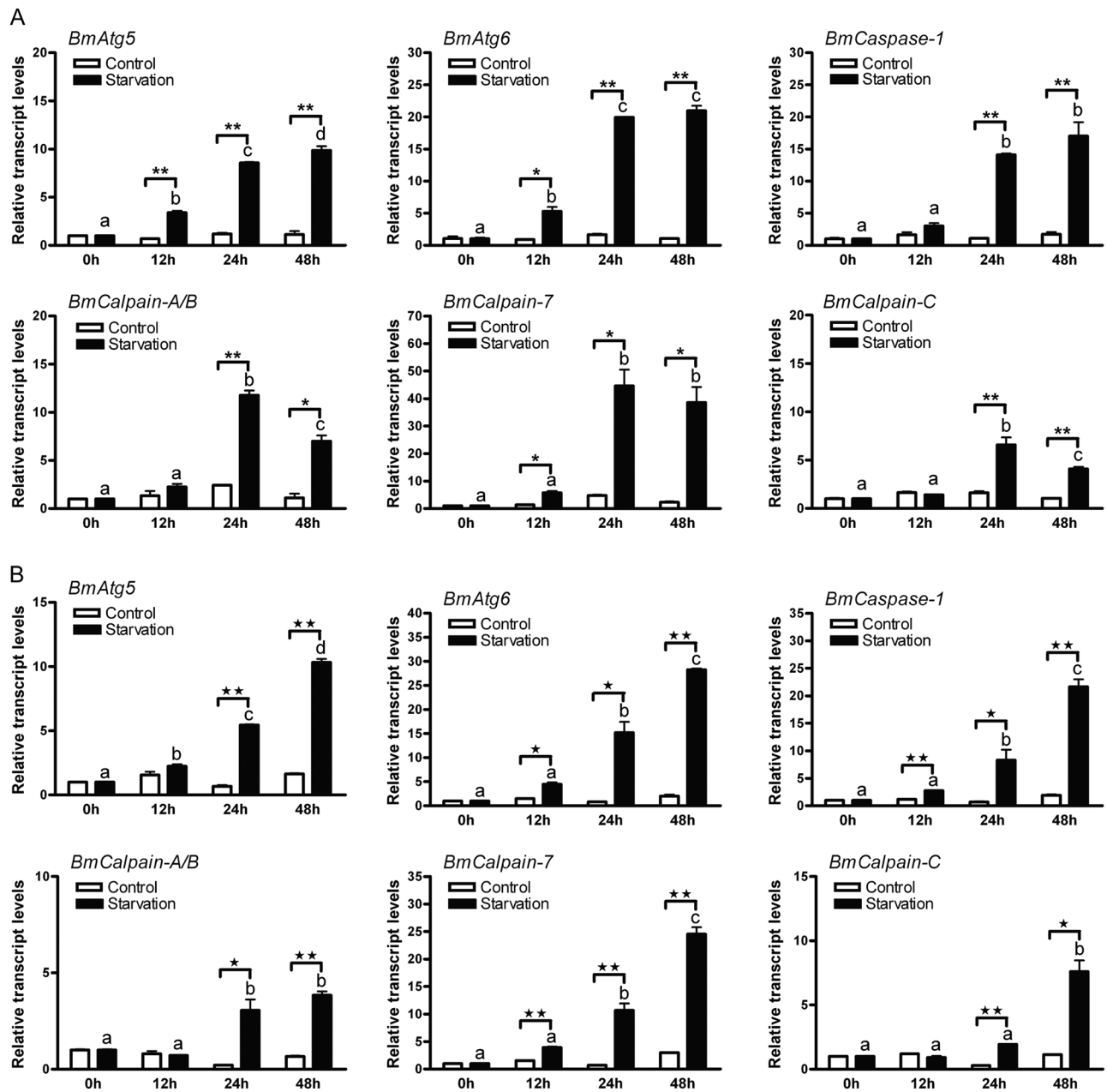


Fig. 3 Induced expressions of *BmCalpains* by starvation. Similar to expression of *BmAtg5*, *BmAtg6* and *BmCaspase-1*, expression of *BmCalpain-A/B*, *-C* and *-7* was induced by starvation in the fat body (A) and midgut (B). Relative expression at the beginning of starvation (0 h) was set as 1. Identical letters indicate no significant difference ($P > 0.05$), while different letters indicate significant difference ($P < 0.05$) among different times. * ($P < 0.05$) and ** ($P < 0.01$) indicate significant differences between control and starved groups.

starvation from 6 to 24 h, but red staining decreased slightly after 48 h starvation (data not show). Then qRT-PCR analysis (Fig. 5A) showed that expression of *BmAtg5*, *BmAtg6* and *BmCaspase-1* was induced after starvation for 24 h and continued to increase after

starvation for 48 and 72 h. Expression of *BmAtg5* and *BmAtg6* reached a peak at 48 h after starvation. Consistent with expression of *BmAtg5*, *BmAtg6* and *BmCaspase-1*, expression of *BmCalpain-A/B* and *BmCalpain-7* was also significantly induced by starvation. *BmCalpain-A/B*

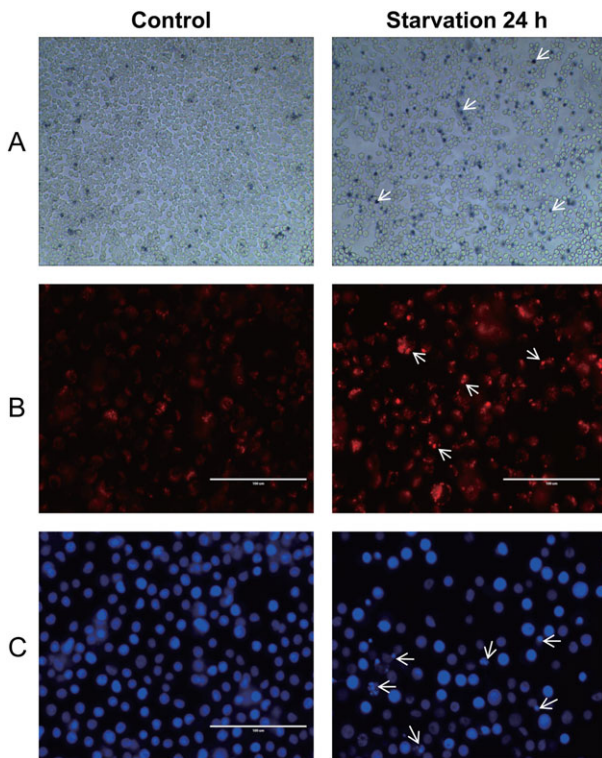


Fig. 4 Cell death, autophagy and apoptosis induced by starvation in Bm-12 cells. Cell death, autophagy and apoptosis were induced by amino acid starvation in Bm-12 cells. Staining results are shown after starvation for 24 h. (A) Cell death was detected by trypan blue staining and observed at 20 \times magnification. (B) Autophagy was monitored by LysoTracker Red staining and cells were observed at 40 \times magnification. (C) Apoptosis was monitored by Hoechst 33258 staining and cells were observed at 40 \times magnification. The arrows denote typical trypan blue-stained dead cells, LysoTracker Red-stained autophagolysosome and Hoechst-stained chromatic condensation cells, respectively.

displayed distinct induction starting from 24 h of starvation and reached a peak at 48 h. *BmCalpain-7* was induced from 12 h after starvation and its expression continued to increase after starvation for 24, 48 and 72 h, which is similar to expression of *BmCaspase-1*. Western blotting analysis of BmATG6 (Fig. 5B) showed that the intensity of BmATG6 bands was increased along with starvation times and two cleavage bands (37 and 35 kDa) were detected after starvation for 36 h, indicating that BmCalpains may be involved in the cleavage of BmATG6. In order to further determine the effects of BmCalpains on cleavage of BmATG6, we tested whether calpain inhibitors are able to inhibit the cleavage of BmATG6. Cells were treated with AD alone, AD plus calpain inhibitor MDL 28170, or AD plus caspase inhibitor Z-VAD-fmk

(Fig. 5C). As an inducer of apoptosis, AD alone led to cleavage of BmATG6 in Bm-12 cells as previously reported (Xie *et al.*, 2016). Autophagy inhibitor 3-MA significantly increased the intensity of the two cleavage bands (37 and 35 kDa), while calpain inhibitor MDL 28170 only inhibited the cleavage of the 37 kDa band but not the 35 kDa band, and caspase inhibitor Z-VAD-fmk inhibited cleavage of both the 37 kDa and 35 kDa bands. Interestingly, when both MDL 28170 and Z-VAD-fmk were applied, cleavage of both the 37 kDa and 35 kDa bands was completely inhibited. These results suggest that BmCalpains may work with BmCaspases to mediate the apoptosis-associated cleavage of BmATG6.

Discussion

As major intracellular proteolytic enzymes ubiquitously expressed in cells, calpains have multiple functions and are related to various pathological diseases (Branca, 2004). However, the detailed functions and mechanisms are still ambiguous and even becoming more complex because of their diverse isoforms and variants. In this study, we first analyzed and verified all calpain isoforms of *B. mori*, and then investigated their expression profiles and functions.

Five calpains were identified in *B. mori*, including BmCalpain-A/B, -C, -7, -D and -11. BmCalpain-A/B, similar to DmCalpain-A and -B, has four isoforms and is the only classical calpain of *B. mori* with typical calpain domains as human calpain-1 and calpain-2. Unlike human calpain-1 and calpain-2 (Smith & Schnellmann, 2012), BmCalpain-A/B may be active as monomers like DmCalpain-B because of the absence of the small subunit in *B. mori*. Similar to DmCalpain-C (Spadoni *et al.*, 2003), BmCalpain-C contains mutated active sites and may be catalytically inactive. BmCalpain-7 is the homolog of HsCalpain-7, which belongs to the evolutionarily conserved PalB atypical calpain superfamily with two tandem C2L/C2 domains (Franz *et al.*, 1999). *BmCalpain-A/B*, -C and -7 were expressed in the fat body, midgut and prothoracic gland of *B. mori*. BmCalpain-D, similar to DmCalpain-D and HsCalpain-15, is comprised of several Zn²⁺ fingers at N-terminus but lacks PC2 domain. BmCalpain-11 is an atypical calpain and also contains mutated active sites. Functions of BmCalpain-D and BmCalpain-11 need to be further confirmed.

The expression profiles of *BmCalpains* in the fat body and midgut of *B. mori* larvae as well as in the Bm-12 cells were consistent with those of *BmAtg5*, *BmAtg6* and *BmCaspase-1*, suggesting that BmCalpain-A/B, -C and -7, may be involved in autophagy and

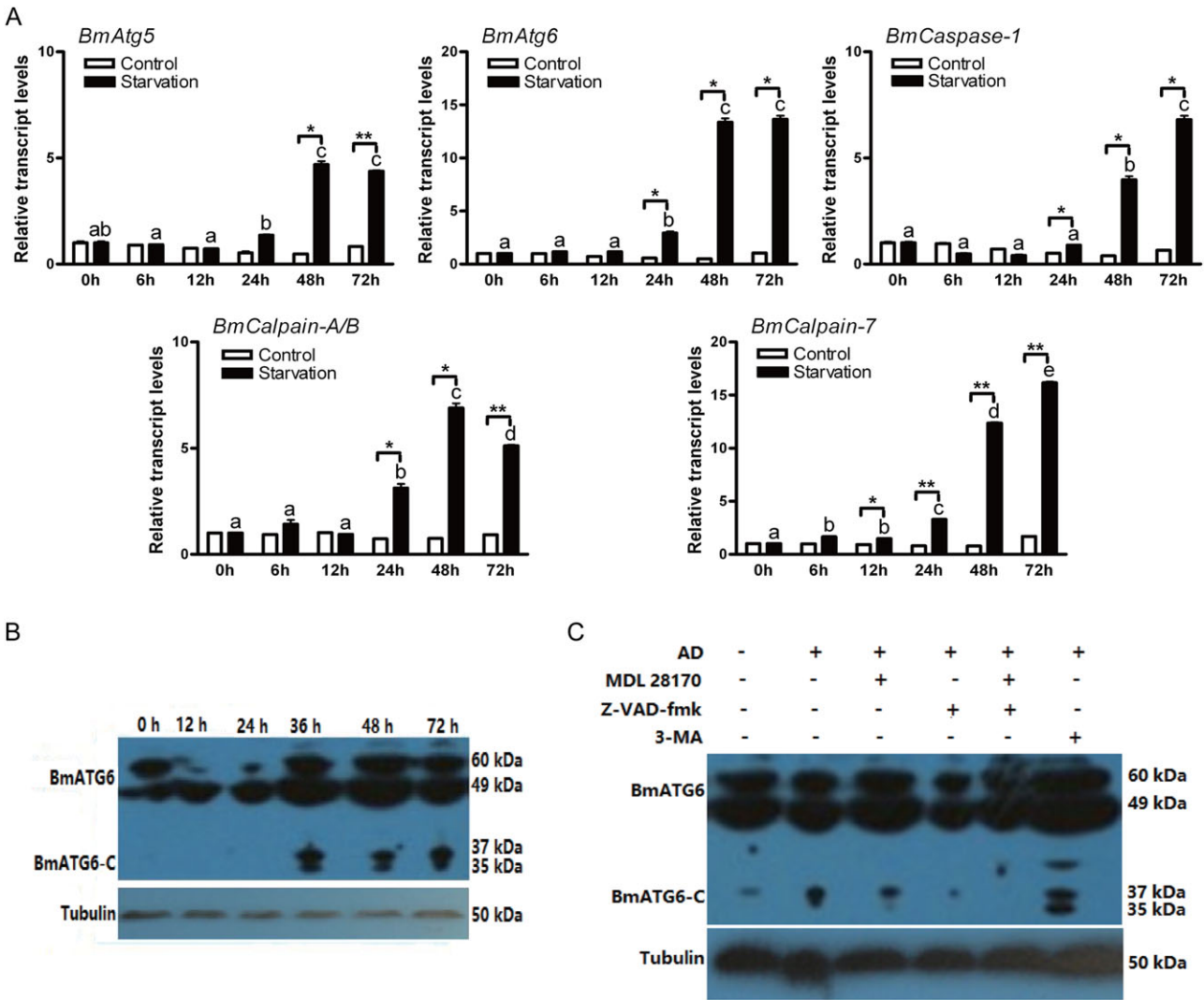


Fig. 5 Cleavage of BmATG6 by BmCalpains in Bm-12 cells. (A) *BmCalpains* were induced by starvation. Relative expression at the beginning of starvation (0 h) was set as 1. Identical letters indicate no significant difference ($P > 0.05$), while different letters indicate significant difference ($P < 0.05$) among different times. * ($P < 0.05$) and ** ($P < 0.01$) indicate significant differences between control and starved groups. (B) Western blotting analysis of BmATG6 after starvation for 0, 12, 24, 36, 48 and 72 h. The apoptosis-associated bands (35 and 37 kDa) of BmATG6 were significantly produced after starvation for 36 h. (C) Effects of calpain and caspase inhibitors on the cleavage of BmATG6 induced by actinomycin D (AD) treatment. AD, apoptosis inducer; MDL 28170, calpain inhibitor; Z-VAD-fmk, caspase inhibitor; 3-MA, autophagy inhibitor.

apoptosis in *B. mori*. As reported in mammalian cells (Demarchi *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2008), calpains function as pro- or anti-apoptotic factors and show opposite functions in apoptosis and autophagy. Interestingly, autophagy and apoptosis occur simultaneously in the fat body (Tian *et al.*, 2012, 2013), but autophagy precedes apoptosis in the midgut during *B. mori* metamorphosis (Franzetti *et al.*, 2012). We showed that the induced expression patterns of *BmCalpains* in the fat body and midgut were different, and *BmCalpains* were constantly induced by starvation in

the midgut but the induction in the fat body declined after 48 h starvation (Fig. 3). Thus, the interconnections of autophagy and apoptosis in *B. mori* are different in the fat body and midgut, and the detailed effects of *BmCalpains* may be different and need to be further investigated.

One important finding in this study is that *BmCalpains* may work together with *BmCaspases* to mediate apoptosis-associated cleavage of BmATG6. First, the apoptosis-associated cleavage forms (35 and 37 kDa) of BmATG6 were significantly produced after *BmAtg6*,

BmCaspase-1, *BmCalpain-A/B* and *-7* were induced in the Bm-12 cells after starvation for 24 h (Fig. 5A and 5B). Second, the apoptosis-associated cleavage of BmATG6 was partially inhibited when an inhibitor of either calpains or caspases was used separately, but completely inhibited when both inhibitors were applied together (Fig. 5C). In mammalian cells, calpain-1 can cleave ATG6 into 50 kDa fragment while caspase-3, -7 and -8 cleave ATG6 into apoptosis-associated forms (35 and 37 kDa) *in vitro* (Wirawan *et al.*, 2010). Interestingly, calpain-1 was also confirmed to cleave and activate caspase-7 (Gafni *et al.*, 2009). Thus, we speculate that BmCalpains may mediate the apoptosis-associated cleavage of ATG6 through activation of some BmCaspases. Calpains have been confirmed to mediate the apoptosis-associated cleavage of ATG5 in mammalian cells (Yousefi *et al.*, 2006), and recombinant BmATG5 can be cleaved by calpain (Xie *et al.*, 2016). But in our experiments, expression of *BmAtg5* induced by starvation in both *B. mori* tissues and Bm-12 cells was significantly lower than that of *BmAtg6* (Fig. 3 and 5A), and the truncated BmATG5 (24 kDa) was almost not detected by Western blot analysis (data not shown). Future studies are required to confirm the effects of BmCalpains on BmATG5 cleavage and to elucidate the detailed mechanism.

In conclusion, we showed that BmCalpain-A/B, -C and -7 are involved in autophagy and apoptosis in *B. mori*, and in mediating the apoptosis-associated cleavage of BmATG6. Although *BmCalpain-7* was induced to a higher level and at an earlier time than *BmCalpain-A/B* and *BmCalpain-C* by starvation, whether it plays a leading role or is in co-operation with other BmCalpains needs to be further investigated.

Acknowledgments

This study was supported by grants from National Basic Research Program of China (973 program) (No. 2012CB114600), National Natural Science Foundation of China (No. 31101765), and Natural Science Foundation of Guangdong Province of China (No. 2015A030313396).

Disclosure

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Betin, V.M.S. and Lane, J.D. (2009) Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *Journal of Cell Science*, 122, 2554–2566.
- Branca, D. (2004) Calpain-related diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322, 1098–1104.
- Cheng, Y., Qiu, F., Huang, J., Tashiro, S., Onodera, S. and Ikejima, T. (2008) Apoptosis-suppressing and autophagy-promoting effects of calpain on oridonin-induced L929 cell death. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 475, 148–155.
- Croall, D.E. and Ersfeld, K. (2007) The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome Biology*, 8, 218.
- Demarchi, F., Bertoli, C., Copetti, T., Tanida, I., Brancolini, C., Eskelinen, E. and Schneider, C. (2006) Calpain is required for macroautophagy in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 175, 595–605.
- Djavaheri-Mergny, M., Maiuri, M.C. and Kroemer, G. (2010) Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene*, 29, 1717–1719.
- Franz, T., Vingron, M., Boehm, T. and Dear, T.N. (1999) Capn7: a highly divergent vertebrate calpain with a novel C-terminal domain. *Mammalian Genome*, 10, 318–321.
- Franzetti, E., Huang, Z.J., Shi, Y.X., Xie, K., Deng, X.J., Li, J.P., Li, Q.R., Yang, W.Y., Zeng, W.N., Casartelli, M., Deng, H.M., Cappellozza, S., Grimaldi, A., Xia, Q.Y., Tettamanti, G., Cao, Y. and Feng, Q.L. (2012) Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis*, 17, 305–324.
- Gafni, J., Cong, X., Chen, S.F., Gibson, B.W. and Ellerby L.M. (2009) Calpain-1 cleaves and activates caspase-7. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 25441–25449.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W. and Cong, J. (2003) The calpain system. *Physiological Reviews*, 83, 731–801.
- Gozuacik, D. and Kimchi, A. (2007) Autophagy and cell death. *Current Topics in Developmental Biology*, 78, 217–245.
- Jekely, G. and Friedrich, P. (1999) Characterization of two recombinant *Drosophila* Calpains. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 23893–23900.
- Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T. and Tang, D. (2011) The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 18, 571–580.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Li, Q.R., Deng, X.J., Yang, W.Y., Huang, Z.J., Tettamanti, G., Cao, Y. and Feng, Q.L. (2010) Autophagy, apoptosis, and ecdysis-related gene expression in the silk gland of the silkworm (*Bombyx mori*) during metamorphosis. *Canadian Journal of Zoology*, 88, 1169–1178.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A. and Kroemer, G. (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Molecular Cell Biology*, 8, 741–752.

- Martinet, W., Meyer, G.R.Y.D., Herman, A.G. and Kockx, M.M. (2005) Amino acid deprivation induces both apoptosis and autophagy in murine C2C12 muscle cells. *Biotechnology Letters*, 27, 1157–1163.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M. and Klionsky, D.J. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451, 1069–1075.
- Núñez, G., Benedict, M.A., Hu, Y. and Inohara, N. (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, 17, 3237–3245.
- Ono, Y. and Sorimachi, H. (2012) Calpains – an elaborate proteolytic system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824, 224–236.
- Oral, O., Oz-Arslan, D., Itah, Z., Naghavi, A., Deveci, R., Karacali, S. and Gozuacik, D. (2012) Cleavage of Atg3 protein by caspase-8 regulates autophagy during receptor-activated cell death. *Apoptosis*, 17, 810–820.
- Park, M.W. and Emori, Y. (2008) *Drosophila* Calpain B is monomeric and autolyzes intramolecularly. *The Japanese Biochemical Society*, 143, 217–228.
- Pearson, W.R., Wood, T., Zhang, Z. and Miller, W. (1997) Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics*, 46, 24–36.
- Rawlings, N.D. (2015) Bacterial calpains and the evolution of the calpain (C2) family of peptidases. *Biology Direct*, 10, 66.
- Riedl, S.J. and Shi, Y.G. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Molecular Cell Biology*, 5, 897–907.
- Smith, M.A. and Schnellmann, R.G. (2012) Calpains, mitochondria and apoptosis. *Cardiovascular Research*, 96, 32–37.
- Spadoni, C., Farkas, A., Sinka, R., Tompa, P. and Friedrich, P. (2003) Molecular cloning and RNA expression of a novel *Drosophila* calpain, Calpain C. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303, 343–349.
- Sumithra, P., Britto, C.P. and Krishnan, M. (2010) Modes of cell death in the pupal perivisceral fat body tissue of the silkworm *Bombyx mori* L. *Cell Tissue Research*, 339, 349–358.
- Theopold, U., Pinter, M., Daffre, S., Tryselius, Y., Friedrich, P., Nassel, D.R. and Hultmark, D. (1995) *CalpA*, a *Drosophila* calpain homolog specifically expressed in a small set of nerve, midgut, and blood Cells. *Molecular Cell Biology*, 15, 824–834.
- Tian, L., Liu, S.M., Liu, H.H. and Li, S. (2012) 20-hydroxyecdysone upregulates apoptotic genes and induces apoptosis in the *Bombyx* fat body. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 79, 207–219.
- Tian, L., Ma, L., Guo, E.E., Deng, X.J., Ma, S.Y., Xia, Q.Y., Cao, Y. and Li, S. (2013) 20-hydroxyecdysone upregulates *Atg* genes to induce autophagy in the *Bombyx* fat body. *Autophagy*, 9, 1172–1187.
- Wei, W., Gai, Z.C., Ai, H., Wu, W.X., Yang, Y.B., Peng, J.X., Hong, H.Z., Li, Y. and Liu, K.Y. (2012) Baculovirus infection triggers a shift from amino acid starvation-induced autophagy to apoptosis. *PLoS ONE*, 7, e37457.
- Wirawan, E., Walle, L.V., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., Rycke, R.D., Verspurten, J., Declercq, W., Agostinis, P., Berghe, T.V., Lippens, S. and Vandenabeele, P. (2010) Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Disease*, 1, 1–10.
- Wu, H.J., Che, X.R., Zheng, Q.L., Wu, A., Pan, K., Shao, A.W., Wu, Q., Zhang, J.M. and Hong, Y. (2014) Caspases: A molecular switch node in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *International Journal of Biological Sciences*, 10, 1072–1083.
- Xie, K., Tian, L., Guo, X.Y., Li, K., Li, J.P., Deng, X.J., Li, Q., Xia, Q.Y., Zhong, Y., Huang, Z., Liu, J., Li, S., Yang, W. and Cao, Y. (2016) BmATG5 and BmATG6 mediate apoptosis following autophagy induced by 20-hydroxyecdysone or starvation. *Autophagy*, 12, 381–396.
- Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, H. and Simon, H. (2006) Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature Cell Biology*, 8, 1124–1132.
- Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E.H. and Lenardo, M. J. (2004) Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*, 304, 1500–1502.
- Zhang, J.Y., Pan, M.H., Sun, Z.Y., Huang, S.J., Yu, Z.S., Liu, D., Zhao, D.H. and Lu, C. (2010) The genomic underpinnings of apoptosis in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 11, 611, <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/611>.

Manuscript received May 27, 2016

Final version received September 20, 2016

Accepted October 7, 2016

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Table S1 Primers for quantitative real-time PCR.

Table S2 Calpains from *B. mori*, *D. melanogaster* and *H. sapiens*.

Fig. S1 Sequence alignment of four isoforms of BmCalpain-A/B.

Fig. S2 Sequence alignment of CysPc domains of BmCalpain-A/B, -C, -7 and their homologs.

Fig. S3 Alignment of CysPc domains of BmCalpain-D, -11 and their homologs.

三、论文、著作等

3. 以通讯作者发表本专业论文情况

3.1 **Clathrin-dependent endocytosis predominantly mediates protein absorption by fat body from the hemolymph in *Bombyx mori***

Insect Science

Editor-in-Chief:
Le Kang



WILEY

www.wileyonlinelibrary.com/journal/ins

Insect science

Contents

Review

- 626 A global invasion by the thrips, *Frankliniella occidentalis*: Current virus vector status and its management
Z. He, J. F. Guo, S. R. Reitz, Z. R. Lei and S. Y. Wu

Original articles

- 646 MicroRNA-2738 regulates gene expression in the sex determination pathway in *Bombyx mori*
Z. L. Liu, J. Xu, L. Ling, D. H. Yang, S. Q. Chen and Y. P. Huang
- 655 *BmSd* gene regulates the silkworm wing size by affecting the Hippo pathway
J. Yin, J. Zhang, T. Li, X. Sun, S. Qin, C. X. Hou, G. Z. Zhang and M. W. Li
- 665 Dual roles of juvenile hormone signaling during early oogenesis in *Drosophila*
W. Luo, S. Veeran, J. Wang, S. Li, K. Li and S. N. Liu
- 675 Clathrin-dependent endocytosis predominantly mediates protein absorption by fat body from hemolymph in *Bombyx mori*
Y. J. Wang, S. Y. Li, J. Y. Zhao, K. Li, J. Xu, X. Y. Xu, W. M. Wu, R. Yang, Y. Xiao, M. Q. Ye, J. P. Liu, Y. J. Zhong, Y. Cao, H. Y. Yi and L. Tian
- 687 Identification of a *PP2A* gene in *Bombyx mori* with antiviral function against *B. mori* nucleopolyhedrovirus
Z. G. Hu, Z. Q. Dong, F. F. Dong, Y. Zhu, P. Chen, C. Lu and M. H. Pan
- 697 Hedgehog promotes cell proliferation in the midgut of silkworm, *Bombyx mori*
S. Q. Zhu, Y. J. Zhang, M. N. Abbas, X. W. Hao, Y. Z. Zhao, H. H. Liang, H. J. Cui and L. Q. Yang
- 708 Australian sugarcane soldier fly's salivary gland transcriptome in response to starvation and feeding on sugarcane crops
K. Etebari, K. R. Lindsay, A. L. Ward and M. J. Furlong
- 721 Molecular and functional characterization of three odorant-binding proteins from the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana*
W. N. Cheng, Y. D. Zhang, W. Liu, G. W. Li and K. Zhu-Salzman
- 735 Identification of two clip domain serine proteases involved in the pea aphid's defense against bacterial and fungal infection
L. Ma, F. Chen, W. Wang, L. Xu and Z. Q. Lu
- 745 Wild bacterial probiotics fed to larvae of mass-reared Queensland fruit fly [*Bactrocera tryoni* (Froggatt)] do not impact long-term survival, mate selection, or locomotor activity
L. A. Shuttleworth, M. A. M. Khan, D. Collins, T. Osborne and O. L. Reynolds
- 756 Involvement of mind the gap in the organization of the tracheal apical extracellular matrix in *Drosophila* and *Nilaparvata lugens*
X. Z. Yue, D. Li, J. Lv, K. Liu, J. Chen and W. Q. Zhang
- 771 Behavioral evidence for contextual olfactory-mediated avoidance of the ubiquitous phytopathogen *Botrytis cinerea* by *Drosophila suzukii*
D. H. Cha, S. P. Hesler, G. Brind'Amour, K. S. Wentworth, S. Villani, K. D. Cox, M. T. Boucher, A. Wallingford, S. K. Park, J. Nyrop and G. M. Loeb
- 780 Initial detections and spread of invasive *Spodoptera frugiperda* in China and comparisons with other noctuid larvae in cornfields using molecular techniques
D. P. Jing, J. F. Guo, Y. Y. Jiang, J. Z. Zhao, A. Sethi, K. L. He and Z. Y. Wang
- 791 Identification of the ryanodine receptor mutation I4743M and its contribution to diamide insecticide resistance in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)
Y. Y. Zuo, H. H. Ma, W. J. Lu, X. L. Wang, S. W. Wu, R. Nauen, Y. D. Wu and Y. H. Yang
- 801 Female competition for availability of males in insects: the *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) model
A. Čokl, A. Žunič Kosi, R. A. Laumann and M. Virant-Doberlet
- 815 The endoparasitoid *Psyllaephagus arenarius* benefits from the ectoparasitic venom via multiparasitism with the ectoparasitoid *Tamarixia lyciumi*
P. X. Wu, B. X. Ma, F. M. Wu, J. Xu and R. Z. Zhang
- 826 Diversity and seasonal variation of ground and understory spiders from a tropical mountain cloud forest
E. F. Campuzano, G. Ibarra-Núñez, S. Machkour-M'Rabet, A. Morón-Ríos and M. L. Jiménez

CN 11-6019/Q

ISSN 1672-9609




0 8>

9 771672 960206

WILEY

ORIGINAL ARTICLE

Clathrin-dependent endocytosis predominantly mediates protein absorption by fat body from the hemolymph in *Bombyx mori*

Yu-Jie Wang¹, Shu-Yan Li¹, Jia-Ye Zhao¹, Kang Li², Jing Xu¹, Xian-Ying Xu¹, Wen-Mei Wu¹, Rong Yang¹, Yang Xiao³, Ming-Qiang Ye³, Ji-Ping Liu¹, Yang-Jin Zhong¹, Yang Cao¹, Hui-Yu Yi¹ and Ling Tian¹ 

¹Guangdong Provincial Key Lab of Agro-Animal Genomics and Molecular Breeding / Guangdong Provincial Sericulture and Mulberry Engineering Research Center, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou, China; ²Guangdong Provincial Key Laboratory of Insect Developmental Biology and Applied Technology, Institute of Insect Science and Technology, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou, China and ³The Sericultural and Agri-Food Research Institute of the Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, China

Abstract During insect larval–pupal metamorphosis, proteins in the hemolymph are absorbed by the fat body for the maintenance of intracellular homeostasis; however, the type of proteins and how these proteins are internalized into the fat body are unclear. In *Bombyx mori*, the developmental profiles of total proteins in the hemolymph and fat body showed that hemolymph-decreased protein bands (55–100 kDa) were in accordance with those protein bands that increased in the fat body. Inhibition of clathrin-dependent endocytosis predominantly blocked the transportation of 55–100 kDa proteins from the hemolymph into the fat body, which was further verified by RNA interference treatment of *Bmclathrin*. Six hexamerins were shown to comprise ~90% of the total identified proteins in both the hemolymph and fat body by mass spectrum (MS) analysis. In addition, hemolymph-specific proteins were mainly involved in material transportation, while fat body-specific proteins particularly participated in metabolism. In this paper, four hexamerins were found for the first time, and potential proteins absorbed by the fat body from the hemolymph through clathrin-dependent endocytosis were identified. This study sheds light on the protein absorption mechanism during insect metamorphosis.

Key words *Bombyx mori*; clathrin-mediated endocytosis; fat body; hemolymph; uptake of proteins

Introduction

Hemolymph and fat body are the two key tissues for material transportation, storage or utilization in insects.

Correspondence: Ling Tian and Hui-Yu Yi, College of Animal Science, South China Agricultural University, Wushan Road 483, Guangzhou 510642, China. Tel: +86 20 85284735; email: tianling@scau.edu.cn; yihy@scau.edu.cn

Moreover, they are both involved in innate immunity against invading pathogens (Da Cruz-Landim *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2019). Hemolymph, an open circulatory system, is pivotal for nutrient storage and transportation and acts as a site for phagocytosis nodulation and encapsulation in addition to proteolytic activation of phenoloxidase (PO) and antimicrobial proteins/peptides (AMPs) released from the fat body (Kumar *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018). Fat body is analogous to mammalian liver and adipose tissue and is mainly responsible for energy, carbohydrates, protein metabolism and

innate immunity in insects (Tian *et al.*, 2010 a, b; Li *et al.*, 2019). Fat body senses multiple extracellular signals derived from hormones, the environment and intracellular conditions, and the exchange of materials between the fat body and hemolymph is tightly controlled by cellular requirements and homeostasis. In particular, the fat body absorbs extracellular materials or signal molecules from the hemolymph to meet the requirements of metamorphosis (Geiser *et al.*, 2012; Da Cruz-Landim *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2019).

During the maintenance of homeostasis in fat body, molecules communicate between the hemolymph and fat body. Several proteins are transported between the hemolymph and fat body, including hexamerins, apolipoproteins and transferrins mediated by their receptors (Ryan & van der Horst, 2000; Arif *et al.*, 2008; Geiser *et al.*, 2012). Hexamerins (storage proteins) are the major proteins in the hemolymph synthesized by the fat body during feeding stage of larvae, which are absorbed by the fat body to provide amino acid resources for the biosynthesis of vitellogenin at later stages of larvae (Levenbook, 1985; Sakurai *et al.*, 1988; Da Cruz-Landim *et al.*, 2013). In *Bombyx mori*, two storage proteins have been identified as storage protein 1 (SP1) and storage protein 2 (SP2). SP1 is a major plasma protein that accumulates in female larval hemolymph in a stage-specific manner (Sakurai *et al.*, 1988). SP2 is an arylphorin-type protein and belongs to the same superfamily as arthropod PO, which also possesses anti-apoptotic functions similar to SP1 (Burmester, 2002; Rhee *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2017). Apolipoproteins are dispersed in the hemolymph, and function as lipid shuttles (Ryan & van der Horst, 2000). In addition, apolipoproteins have been shown to mediate immunity in insects, including facilitating encapsulation and bactericidal activity and activating the prophenoloxidase (PPO) system (Wen *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2018). Transferrins are glycoproteins that permit effective passage of relatively toxic or hydrated ferric ion through the vertebrate vascular system (Huebers & Finch, 1987; Geiser *et al.*, 2012). Transferrins also have multiple functions together with immune proteins and are involved in adaption to various stresses (Geiser *et al.*, 2012). Fat body is the synthetic organ for hemolymph apolipoproteins and transferrin (Ryan & van der Horst, 2000; Geiser *et al.*, 2012). To date, there are two isoforms of transferrin and three apolipoproteins identified in *Bombyx*, which are more or less associated with innate immunity (Tsuchida *et al.*, 1997; Gopalapillai *et al.*, 2006; Yun *et al.*, 2009; Geiser *et al.*, 2012). Storage proteins, apolipoproteins and transferrin can be transported between the fat body and hemolymph under specific conditions; however, the precise mechanism is not well documented.

Endocytosis is the main pathway for cells sensing environmental changes and obtaining external nutrients and even for the entry of invading pathogens into host cells (Tooze *et al.*, 2014; Pandey, 2015; Feng *et al.*, 2018). External materials are internalized by clathrin-dependent, caveolin-dependent or clathrin- and caveolin-independent pathways; subsequently, they are engulfed in a particular vesicular body known as an endosome and finally delivered to the lysosome for degradation or dispersed into other pathways, such as recycling (Dutta & Donaldson, 2012; Tooze *et al.*, 2014). Clathrin-dependent internalization is usually associated with receptor-mediated endocytosis for the uptake of extracellular materials (Tooze *et al.*, 2014; Pandey, 2015). Moreover, endocytosis is required for the entry of viral pathogens into host cells, including BmNPV and BmCPV in *B. mori* (Chen *et al.*, 2018; Feng *et al.*, 2018). Endocytosis is pivotal for the uptake of extracellular proteins by the fat body from the hemolymph; however, what types of proteins are absorbed and how they are internalized are unclear in *B. mori*.

In *B. mori*, the proteins located at 55–100 kDa were significantly decreased in the hemolymph but increased in fat body at day one of prepupa (PP1). Inhibition of different pathways of endocytosis revealed that clathrin-dependent internalization predominantly mediated the absorption of 55–100 kDa proteins by the fat body from the hemolymph. In addition, four new hexamerins, several transportation-related proteins and innate immunity-related proteins were also identified in those proteins between 55 and 100 kDa, indicating that proteins absorbed from the hemolymph are requisite for multiple functions of the fat body during larval–pupal metamorphosis.

Materials and methods

Insects

The *B. mori* (Dazao) provided by the Sericultural and Agri-Food Research Institute of the Guangdong Academy of Agricultural Sciences (Guangzhou, China), were reared on fresh mulberry leaves in the laboratory at 25 °C under 14 h light : 10 h dark cycles (Guo *et al.*, 2018).

Chemicals

Chlorpromazine hydrochloride (CPZ) was purchased from Medchem Express (Monmouth, NJ, USA, 16802). Cytochalasin D (Cyto D) and genistein were purchased from Meilunbio (Dalian, China, A0206A and MB0784). Dimethyl sulfoxide (DMSO), Bicinchoninic acid (BCA) protein quantitative kit, radioimmunoprecipitation assay

(RIPA) lysis buffer and the protease inhibitor were purchased from Beyotime Biotechnology Co., Ltd. (Shanghai, China, STO38, P0009-1 and P0013B). Protein marker was purchased from Thermo Fisher Scientific (Grand Island, NY, USA, 26616). Coomassie brilliant blue and bromophenol blue were purchased from Guangzhou Xiangbo Biotechnology Co., Ltd. (Guangzhou, China, 101916 and 121515). DL-dithiothreitol (DTT) and iodacetamide (IAM) were purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany, HZB0086 and 16125-5G). Trypsin was purchased from Promega (Madison, WI, USA, V5113). Ammonium bicarbonate acetonitrile (ACN) and formic acid were purchased from Thermo Fisher Scientific (Grand Island, NY, USA, A955-4 and A117-50).

RNA interference (RNAi) experiments

The template for double-stranded RNA (dsRNA) synthesis was amplified by polymerase chain reaction from fat body in *B. mori*, and the dsRNA of *egfp* (F: GGATCC-TAATACGACTCACTATAGGGAGAATGGTGAGCAA GGGCG; R: GGATCCTAATACGACTCACTATAGGG AGACTTGACAGCTCGTCC) and *Bmclathrin* (F: GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAAGTGACG GTAGAGGAAGAC; R: GGATCCTAATACGACTCAC TATAGGGAGTTGGCACGAAGGTAAA) were generated using the T7 RiboMAXTM Express RNAi system (Promega, P1700, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. Each individual larva was injected with dsRNA of *Bmclathrin* (30 μ g) at 12 h before initiation of wandering, and *egfp* dsRNA (30 μ g) was injected as a control (Tian *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2018).

Tissues collection for developmental profiles

Hemolymph and perivisceral fat body from female larvae were collected separately from day 2 of the 5th instar (5L-2) to day 2 of prepupa (PP2). Five larvae per group and three independent biological replicates were used.

Inhibitors treatments

CPZ, Cyto D and genistein were dissolved in DMSO solution, and different doses were designed according to the references and injected into female larvae at the wandering stage. The control larvae were injected with the same volume of DMSO solution (Chen *et al.*, 2018; Feng *et al.*, 2018). After treatment for 24 h, both hemolymph and fat body were collected for further assays.

Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) separation and Coomassie brilliant blue staining

The hemolymph was diluted with phosphate-buffered saline (8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.42 g/L Na₂HPO₄, 0.27 g/L KH₂PO₄, pH 7.0). Fat body was lysed in RIPA lysis buffer supplied with phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and then centrifuged to obtain the supernatant. The protein concentration was detected by the BCA method and adjusted to 5 μ g/ μ L for further analysis. Samples of hemolymph and fat body were separated in a 12% SDS-PAGE gels and further stained with Coomassie brilliant blue solution. Subsequently, the gel was decolorized with destaining solution (ethanol : acetic acid: H₂O = 5 : 10 : 85) until the elimination of background and then submitted to analysis.

Western blotting

Primary antibody against clathrin heavy chain of *B. mori* was generated and used to detect the protein level of Bmclathrin (1 : 2000, ABclonal Biotechnology Co., Ltd, Wuhan, China) according to the standard procedure of Western blotting. Tubulin was used as a reference protein (1 : 5000, Beyotime Biotechnology Co., Ltd., AT819, Shanghai, China).

Identification of proteins by mass spectrum (MS)

The gel-digestion mass-spectrum identification was performed by the Shanghai Majorbio Medical and Technology Company (Shanghai, China). The gel containing targeted protein bands was cut into 0.5 mm³–1 mm³, decolorized by buffer containing 5 mmol/L ammonium bicarbonate in 50% ACN at 37 °C, and then restored with 50 mmol/L DTT at 56 °C for 1 h. The mixture was further treated with 100 mmol/L IAM in darkness for 40 min, followed by trypsin enzymolysis overnight. After drying under a vacuum, the zymolytic peptide was dissolved and adjusted to pH 2–3 and then analyzed by the liquid-phase-tandem MS (Triple TOF5600, AB SCIEX, Concord, ON, Canada) or nano-LC (Eksigent 415, AB SCIEX, Dublin, CA, USA) under standard procedures. Finally, the data from the MS were analyzed on PEAKS studio 8.5 (BSI). National Center for Biotechnology Information and European Bioinformatics Institute databases were used to identify the precise proteins.

Bioinformatics analysis of the identified proteins

Bioinformatics analyses of the identified proteins were performed by online software, including signaling

peptides (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), transmembrane domains (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), and metabolic and signal transduction pathways (<https://www.genome.jp/kegg/>). The proteins were converted into UniProtKB forms and then submitted to <https://string-db.org> for the predication of the interplay between recognized proteins.

Statistical analysis

Experimental data were analyzed by Student's *t*-test, $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$. Throughout the paper, values are represented as the mean \pm standard deviation of three independent experiments.

Results

Developmental profiles of total proteins in hemolymph and fat body

During larval–pupal metamorphosis, extracellular components, including proteins, are supposed to be absorbed by fat body as amino acid resources; however, the precise types of absorbed proteins are not fully exploited in *B. mori*. To reveal the potential proteins absorbed by the fat body, the developmental profiles of total proteins in the hemolymph were parallelly compared with fat the body. An SDS-PAGE gel was used to separate total proteins in the hemolymph and fat body from 5L-2 to PP2, which were subsequently analyzed after Coomassie brilliant blue staining. As indicated, the proteins content in the hemolymph was very low at early stages (5L-2 and 5L-3) of the 5th instar, and $\sim 40\%$ of total proteins were located at the molecular weights of 55–100 kDa, which could be obviously subdivided into three bands and analyzed by Image Studio Lite Ver 5.2. All three-band proteins gradually increased, and peaked at the wandering stage, and then notably declined at the prepupal stage, including PP1 and PP2. Typically, another group of proteins located at 25–35 kDa were also distinguished as three independent bands, which gradually increased until the later stage of prepupa (Fig. 1A). Quantification of proteins between 55 and 100 kDa in the hemolymph at wandering showed that they reached more than four-fold of that at 5L-2 ($\sim 30\%$ of total proteins) and then declined to near the level of 5L-2 at PP1 and PP2, while the proteins between 25 and 35 kDa occupied $\sim 50\%$ of the total proteins at PP2 (Fig. 1B).

Notably, variation of total proteins in the fat body showed that the three protein bands between 55 and 100 kDa remained at very low levels during the feeding stage

and strikingly increased to $\sim 60\%$ of the total proteins at the PP1 stage, showing its correlation with the decreased proteins in the hemolymph (Fig. 1C). In addition, the abundance of proteins between 25 and 35 kDa in fat body was maintained at low levels and slightly increased at the end of the 5th instar in fat body (Fig. 1C). Quantification showed that the 55–100 kDa proteins in fat body at wandering were almost the same as that at 5L-2, while at PP1 suddenly increased to more than 40-fold of that at 5L-2 (Fig. 1D). In contrast, the 25–35 kDa proteins gradually increased from 5L-2 to wandering and then slightly decreased at PP1 and PP2 in the fat body (Fig. 1D). Comparison of total proteins between hemolymph and fat body showed that the variation of 55–100 kDa proteins was coincident with absorption of proteins by the fat body from the hemolymph during the larval–pupal transition.

Inhibition of clathrin-dependent endocytosis mainly blocks the uptake of proteins by fat body from the hemolymph

Extracellular components are transported into cells by endocytosis, through clathrin-dependent, caveolin-dependent or clathrin- and caveolin-independent internalization (Dutta & Donaldson, 2012; Tooze *et al.*, 2014; Pandey, 2015). CPZ, Cyto D and genistein are three universal inhibitors of the clathrin-dependent pathway, caveolin-dependent pathway and F-actin activity, respectively (Guo *et al.*, 2012; Kanlaya *et al.*, 2013). CPZ was previously used to detect the internalization of BmNPV and did not affect the viability of cells at varied doses; moreover, the optimal dose of genistein was also established in *Bombyx* (Feng *et al.*, 2018). To reveal the subtype of internalization of proteins, different doses of CPZ (18, 36, 53, 71 $\mu\text{g/larva}$), Cyto D (2.5, 5, 7.5, 10 $\mu\text{g/larva}$) and genistein (27, 54, 81, 108 $\mu\text{g/larva}$) were used according to the doses used in the references and were first injected into larvae at the initiation of wandering. After treatment for 24 h, hemolymph and fat body were collected for further assays. As detected, the proteins between 55 and 100 kDa gradually accumulated in the hemolymph, and were accordingly reduced in the fat body after different doses of CPZ treatments (Fig. 2A). Quantification of the protein bands also indicated their significant accumulation in the hemolymph and decrease in the fat body (Fig. 2A'). Different doses of Cyto D treatments slightly inhibited the uptake of proteins between 55 and 100 kDa by the fat body from the hemolymph (Fig. 2B–B'). Similarly, after different doses of genistein, the proteins between 55 and 100 kDa also slightly accumulated in the hemolymph (Fig. 2C–C').

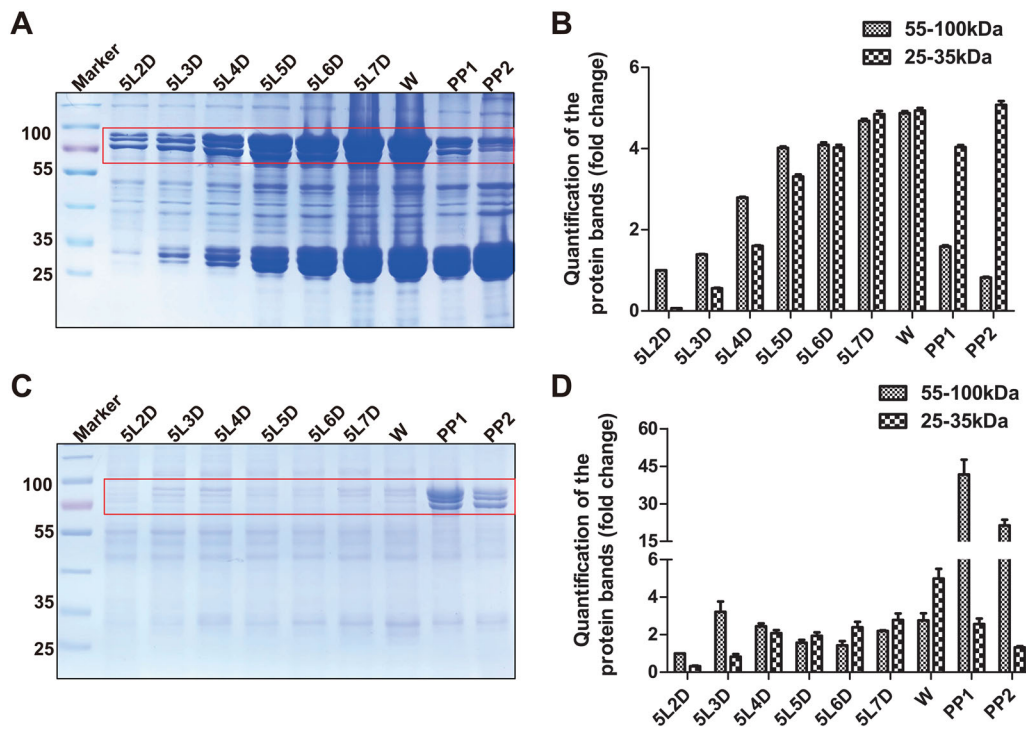


Fig. 1 Developmental profiles of proteins in hemolymph and fat body. Detection of total proteins from 5L-2 to day two of prepupa (PP2) separated by sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels combined with Coomassie brilliant blue staining. (A) The developmental profiles of proteins in the hemolymph. (B) Quantification of proteins at 55–100 kDa and 25–35 kDa in (A), 55–100 kDa proteins from 5L-2 were set as a control. (C) The developmental profiles of proteins in the fat body. (D) Quantification of proteins at 55–100 kDa and 25–35 kDa in (C), 55–100 kDa proteins from 5L-2 were set as a control.

In addition, the optimal doses of CPZ (36 $\mu\text{g/larva}$), Cyto D (5 $\mu\text{g/larva}$) and genistein (54 $\mu\text{g/larva}$) decided by the aforementioned different-dose treatments were further used to verify their regulation of the uptake of proteins. The results showed that CPZ strikingly, while Cyto D and genistein slightly, caused the accumulation of proteins in the hemolymph and decreased proteins in the fat body (Fig. 3A–A'). These results showed that clathrin-dependent endocytosis mainly mediated the uptake of proteins located between 55 and 100 kDa by the fat body from the hemolymph.

To confirm the involvement of Bmclathrin in the uptake of proteins, RNAi of *Bmclathrin* was further performed at 12 h before the initiation of wandering, which caused a significant decrease in the protein levels at 24 h post-RNAi treatments (Fig. 3B). Moreover, the total proteins post-*Bmclathrin* RNAi were separated by SDS-PAGE gels and stained with Coomassie brilliant blue, and the results showed that the 55–100 kDa proteins were dramatically accumulated in the hemolymph and accordingly reduced in the fat body compared to the *egfp* RNAi control (Fig. 3C–C'). The results from *Bmclathrin* RNAi were

consistent with the inhibitory experiments, which verified the predominant involvement of Bmclathrin in the uptake of 55–100 kDa proteins by the fat body from the hemolymph.

Identification of the absorbed proteins in both hemolymph and fat body

Storage proteins are located at molecular weights of 55–100 kDa in insects and stored as amino acid resources for vitellogenin synthesis (Lin *et al.*, 2013); however, the precise types of proteins are not well characterized. According to the developmental profiles, three protein bands from the hemolymph at wandering and three protein bands from the fat body at PP1 between 55 and 100 kDa were all collected for MS identification (Fig. S1). There were 120 proteins identified in the hemolymph and 82 in the fat body, with 42 proteins presented in both tissues (Fig. 4A). According to the protein area identified by MS, SP2 (Q1HPP4, 53.09%), SP1 (P09179, 37.94%), basic juvenile hormone-suppressible protein 2

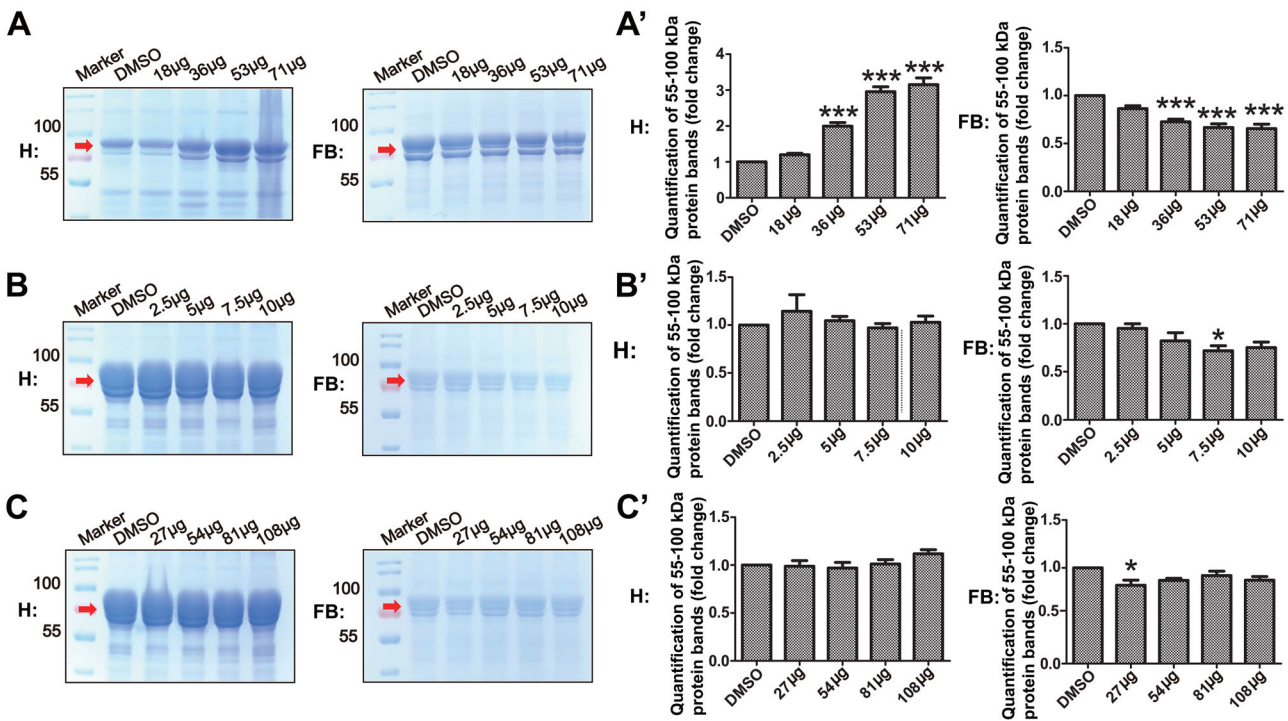


Fig. 2 Variations in proteins from hemolymph and fat body after endocytic inhibitor treatments. (A–A') Proteins separated by SDS-PAGE gel and stained with Coomassie brilliant blue after treatments with different doses of CPZ in both hemolymph and fat body (A). Quantification of proteins between 55 and 100 kDa in A; dimethyl sulfoxide (DMSO) treatment was used as a control (A'). H: hemolymph; FB: fat body; CPZ: chlorpromazine hydrochloride; Cyto D: cytochalasin D; G: genistein. (B–B') Proteins separated by SDS-PAGE gel and stained with Coomassie brilliant blue after treatment with different doses of Cyto D in both hemolymph and fat body (B). Quantification of proteins at 55–100 kDa in B, DMSO treatment was used as a control (B'). (C–C') Proteins separated by SDS-PAGE gel and stained with Coomassie brilliant blue after different-dose genistain treatments in both hemolymph and fat body (C). Quantification of the proteins between 55–100 kDa in C; DMSO treatment was used as control (C').

(H9JH62, 4.00%), arylphorin (G9I6Y1, 2.19%, storage protein 3), arylphorin subunit beta (H9JH63, 0.79%), and heat shock protein 70–3 (F8UN44, 0.31%) were most abundant in hemolymph-identified proteins (Table S1). SP2 (Q1HPP4, 54.21%), SP1 (P09179, 36.10%), arylphorin (G9I6Y1, 3.32%, storage protein 3), basic juvenile hormone-suppressible protein 2 (H9JH62, 2.41%), arylphorin subunit beta (H9JH63, 0.78%), ankyrin repeat domain-containing protein 12 (H9J6K8, 0.57%), atlastin (H9J236, 0.49%) and apolipophorins isoform X2 (apolipophorin II/I, H9JUX8, 0.30%) were the most abundant proteins in the fat body (Table S2). Among the proteins presented in both the hemolymph and fat body, SP2, SP1, basic juvenile hormone-suppressible protein 2, arylphorin, arylphorin subunit beta and heat shock cognate protein were the most abundant proteins. Hexamerins occupied more than 90% of the total identified proteins in both tissues. Moreover, some low abundant proteins, including apolipophorins

(H9JUX8, G1UIS8), transferrins (H9JPG9, O97158), ankyrin repeat domain-containing protein 12 (H9J6K8), and phenoloxidase variations (H9JTA1, H9JTA2 and Q27452), were found in both tissues (Table S3). In general, the proteins identified in the hemolymph at wandering and in the fat body from PP1 were mainly hexamerins.

Hemolymph-specific identified proteins were mainly involved in molecule transportation, including moesin/ezrin/radixin homolog 1 isoform X2 (H9IZ59), ankyrin repeat and BTB/POZ domain-containing protein BTBD11 (H9IUZ2), mutant ABC transporter related-protein (M1G4Y3), scarlet (F1SZW3), protein transport protein Sec23A isoform X2 (H9J5R2), transmembrane protein 214 isoform (H9IX59) and polyadenylate-binding protein (Q0N2S4). Interestingly, the hexamerin named LOW QUALITY PROTEIN: acidic juvenile hormone-suppressible protein 1 (H9JHM8) was only identified in wandering hemolymphs (Table S1).

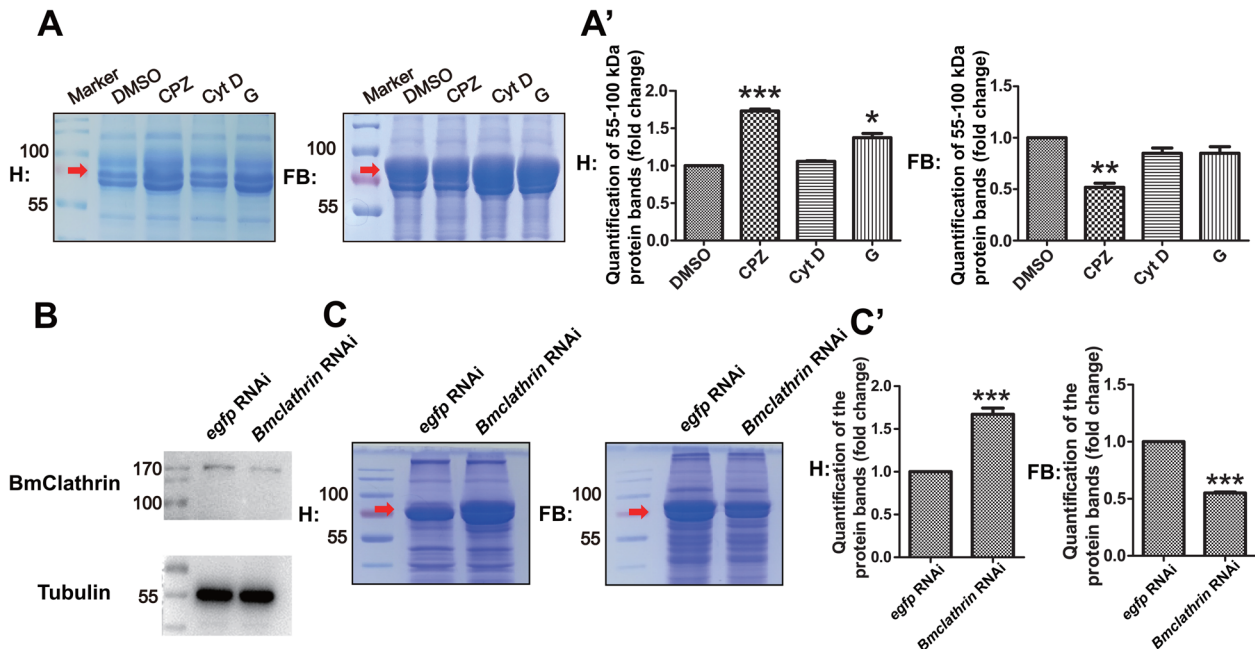


Fig. 3 Variations in proteins from hemolymph and fat body after treatments with optimal doses of endocytic inhibitor and *Bmclathrin* RNAi. (A–A') Proteins separated by SDS-PAGE gel and stained with Coomassie brilliant blue staining after the optimal doses of chlorpromazine hydrochloride (CPZ), cytochalasin D (Cyt D), genistain in hemolymph and fat body (A). Quantification of proteins between 55 and 100 kDa in D; dimethyl sulfoxide (DMSO) treatment was used as a control (A'). (B) Protein level of *Bmclathrin* after RNA interference (RNAi) for 24 h in *B. mori* fat body, *egfp* RNAi was used as a control. (C–C') Total proteins in hemolymph and fat body were separated by SDS-PAGE gels combined with Coomassie brilliant blue staining post-*Bmclathrin* RNAi for 24 h. (C) Quantification of the proteins between 55 and 100 kDa in C (C').

Fat body-specific identified proteins were mainly involved in metabolism, including alpha amylase (D8K-Y55), beta-galactosidase (H9JBC0), apyrase (H9JTT5), inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoform X2 (H9JDG1), serine protease inhibitor 3 isoform X1 (H9J-L11), carboxylic ester hydrolase (B2ZDZ0) and glucose dehydrogenase (H9JTY6). Interestingly, prophenoloxidase-2s (Q9BLG6), Pro-BAEEase (Q2VG86), Toll-like receptor 6 (H9JNC2) and Toll-like receptor 7 isoform X1 (H9ITG4) were specifically present in the fat body. The results showed that the most abundant proteins in both hemolymph and fat body were hexamerins. Moreover, hemolymph-specific proteins were mainly related to molecule transportation, while the fat body-specific proteins were involved in metabolism, implying distinct functions between the hemolymph and fat body.

Pathways and interplay of identified proteins in hemolymph and fat body

The 55–100 kDa identified proteins were further analyzed by Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes software online. Proteins identified in the hemolymph

were mainly involved in metabolic pathways, including the endoplasmic reticulum pathway (protein numbers: 6), pentose phosphate pathway (4), starch and sucrose metabolism (4), thyroid hormone synthesis (4), galactose metabolism (3), lysine degradation (3), amino sugar and nucleotide sugar metabolism (2), arachidonic acid metabolism (2), beta-alanine metabolism (2), and purine, RNA, tRNA metabolism and insulin-PI3K-Akt-mTOR signaling pathways. Notably, some proteins were also involved in endocytosis, lysosome, and the innate immunity against multiple pathogens (Fig. 4B). In the fat body, the identified proteins were predominantly distributed in galactose metabolism (2), lysine degradation (2), protein processing in endoplasmic reticulum (2), hippo signaling pathway (2), endocytosis (2), lysosome (2), apoptosis (2), longevity regulating pathway (2), and several pathways related to innate immunity (Fig. 4C). As indicated, the proteins present in both hemolymph and fat body were mainly involved in galactose metabolism (2), lysine degradation (2), the hippo signaling pathway (2), apoptosis (2), influenza A (2), endocytosis (1), lysosome (1), and some immunity-related pathways (Fig. 4D). In general, the proteins identified in both hemolymph and fat body were

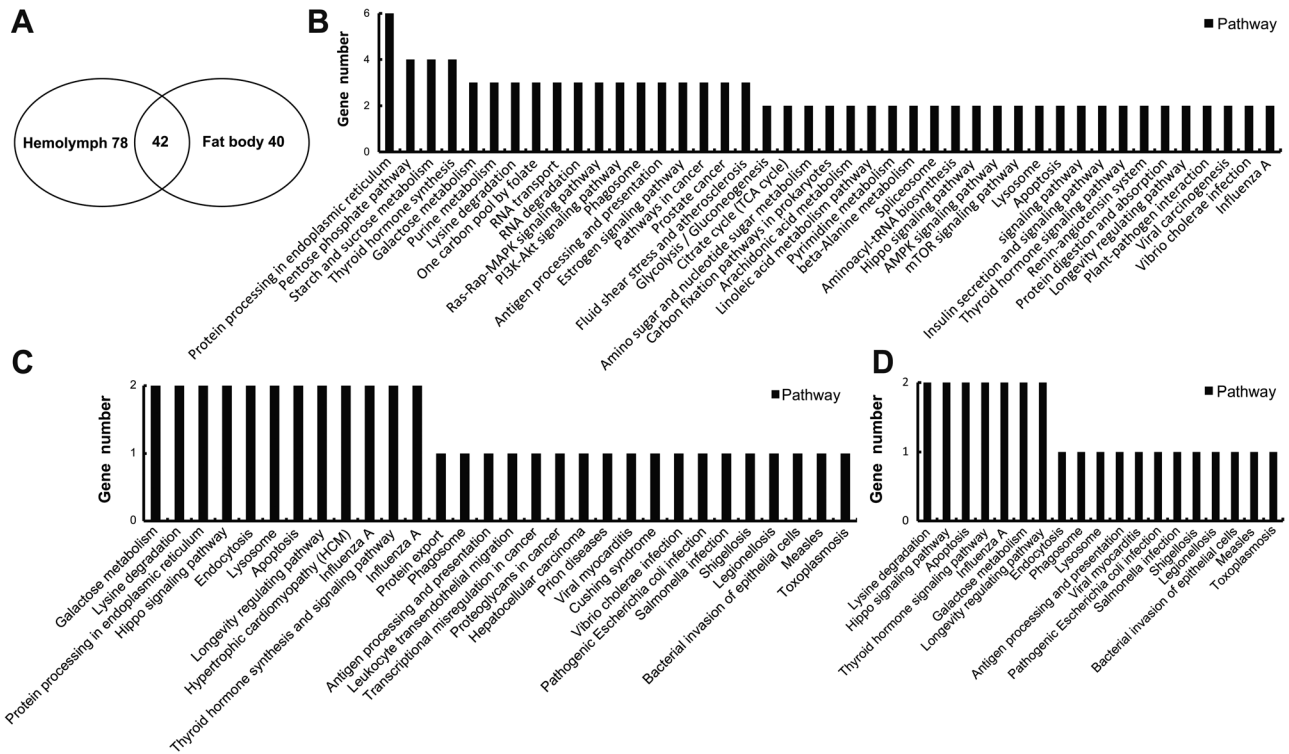


Fig. 4 Pathway analysis of the identified proteins in hemolymph and fat body. (A) Number of identified proteins specific to hemolymph and fat body and common in both tissues. (B) Pathway analysis of identified proteins in the hemolymph. (C) Pathway analysis of identified proteins in the fat body. (D) Pathway analysis of the proteins identified in both hemolymph and fat body.

mainly involved in carbohydrate, fatty acid and amino acid metabolism. Moreover, innate immunity, endocytic-lysosomal and cell death pathways were also essential in the two tissues.

In addressing the functions of the identified proteins, the interplay between them was further analyzed. The relationship of proteins in the hemolymph was more complicated than that in fat body. Peroxisomal multifunctional enzyme type 2, cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase, ubiquitin and ribosomal protein S27a, C-1-tetrahydrofolate synthase, Hsc70 (heat shock cognate protein), Hsp70 (heat shock protein), transferrin, adenosine triphosphate citrate synthase-like and leukotriene A4 hydrolase had close linkages. These proteins were mainly subdivided into two types: functional enzymes and transportation-related proteins (Fig. 5A). Serine protease inhibitor 3, leukotriene A4 hydrolase, mucin-5AC-like and ribosomal protein L7A identified in fat body had a close relationship. Similarly, the transportation-related proteins apolipoproteins, transferrin, heat shock cognate proteins and heat shock proteins had intimate bonds in the fat body (Fig. 5B). The closely related proteins that existed in both the hemolymph and fat body were mainly related to transportation (Fig. 5C).

The identified proteins existed in both hemolymph and fat body were further predicted for their signaling peptides or transmembrane domains. Among the 42 proteins, only two proteins, SP1 and LOW QUALITY PROTEIN: protein piccolo, each had one transmembrane domain. The five other hexamerins, including SP1, SP2, arylphorin, basic juvenile hormone-suppressible protein 2 and arylphorin subunit beta, all contained signaling peptides. Moreover, apolipoprotein and two melanization-related proteins, including phenoloxidase subunit 1 and LOW QUALITY PROTEIN: phenoloxidase subunit 1-like, also possessed signaling peptides, suggesting that they might be secreted from fat body into the hemolymph (Table S4).

Discussion

Six hexamerins are translationally identified in female larvae of B. mori

Hexamerins in insects are mainly divided into four distinct groups: (1) lepidopteran methionine rich proteins; (2) lepidopteran arylphorins; (3) certain lepidopteran juvenile hormone-suppressible proteins; and (4) dipteran storage

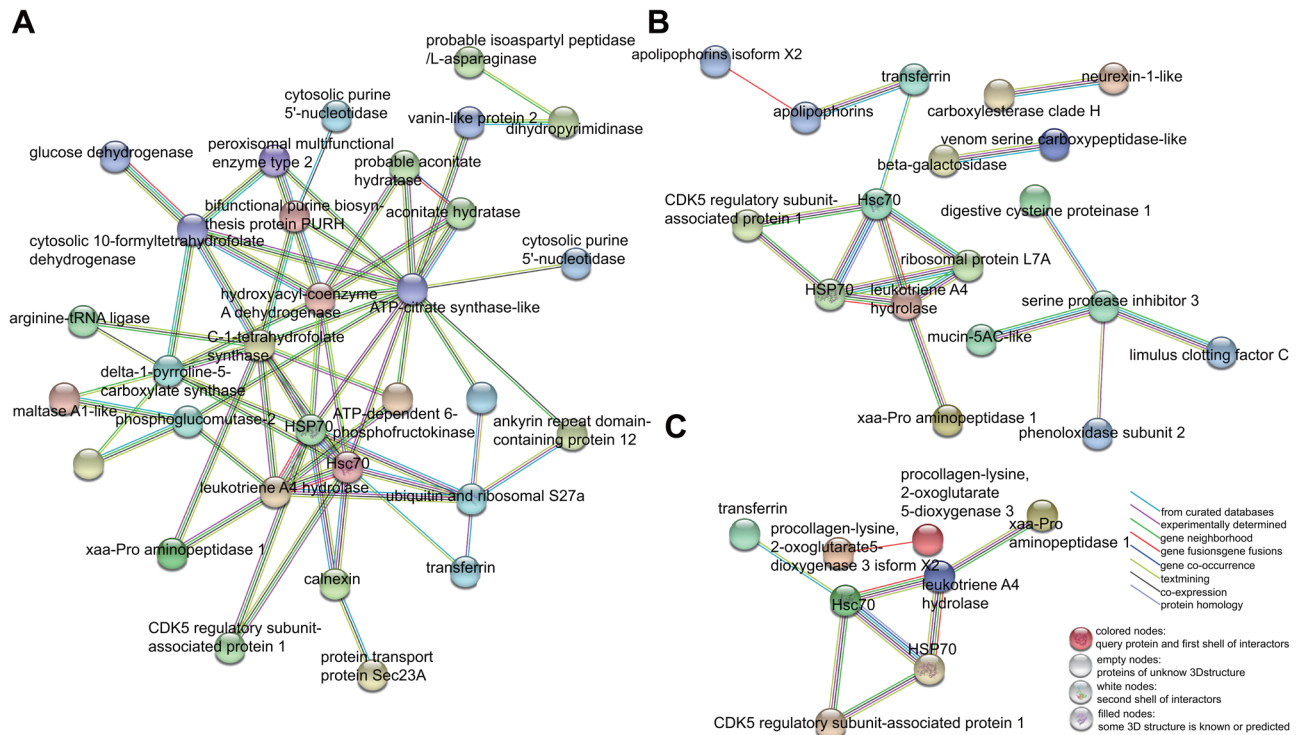


Fig. 5 Interplay of identified proteins in hemolymph and fat body. (A) Predicated interplay of identified proteins in the hemolymph. (B) Predicated interplay of identified proteins in the fat body. (C) Predicated interplay of identified proteins in both hemolymph and fat body. The colored nodes indicate query proteins and the first shell of interactors; white nodes indicate the second shell of interactors; empty nodes indicate proteins with an unknown 3D structure; filled nodes indicate some 3D structure is known or predicted. Different lines indicate different interactions between proteins from different datasets.

proteins (Levenbook, 1985; Haunerland, 1996). *Bombyx* SP1 and SP2 have been previously identified (Sakurai *et al.*, 1988; Fujii *et al.*, 1989). SP1 is a female-specific protein characterized by a high proportion of methionine and is involved in anti-apoptotic or anti-oxidative processes. SP2 is an arylphorin-type storage protein, and inhibits apoptosis in a similar manner to SP1 in mammalian cells (Sakurai *et al.*, 1988; Fujii *et al.*, 1989; Rhee *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2017). Here, in *B. mori* female larvae, six hexamerins were identified as SP1, SP2, arylphorin, basic juvenile hormone-suppressible protein 2, LOW QUALITY PROTEIN: acidic juvenile hormone-suppressible protein 1 and arylphorin subunit beta. All four newly identified hexamerins contain classical hemocyanin N/M/C functional domains. Interestingly, LOW QUALITY PROTEIN: acidic juvenile hormone-suppressible protein 1 only existed in the hemolymph, while all the other five hexamerins were present in both hemolymph and fat body (Table S1–S3). SP1 and SP2 were the two major hexamerins in both hemolymph and fat body, which comprised ~90% of the total identified proteins. Moreover, their proportions in hemolymph and fat body were consistent

at wandering and PP2 stages, implying that SP2 and SP1 were simultaneously absorbed by the fat body from the hemolymph (Table S1–S2). The uptake of these hexamerins is mediated by their receptors and it seems that they are unbiased in binding to clathrin, and then absorbed by the fat body; however, the precise mechanism of absorption needs to be addressed. The six hexamerins were detected in female larvae, and whether some of them also existed in male larvae is unknown. Moreover, the functions of the four new hexamerins are worthy of further study.

Clathrin predominantly mediates the internalization of proteins located at 55–100 kDa by fat body

Endocytosis is the key pathway for cells to maintain homeostasis in response to extra- or intracellular signals, and internalization of extracellular materials is executed in clathrin-dependent or clathrin-independent manners (Tooze *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2018; Feng *et al.*, 2018). Several key proteins are involved in clathrin-dependent

internalization, including dynamin, adaptor protein, actin and Hsc70 protein. Here, the truncated actin, Hsp70 and heat shock cognate proteins were found to exist in both the hemolymph and fat body, suggesting the progress of clathrin-dependent internalization at PP1 stage in *B. mori*. Several proteins are synthesized and released into the hemolymph for storage during feeding-larval stage (Burmester & Scheller, 1997; Ryan & van der Horst, 2000; Geiser & Winzerling, 2012). Due to the reduction of food consumption and high level of 20E, those proteins in the hemolymph are reabsorbed by the fat body through endocytosis for utilization during larval–pupal metamorphosis. As expected, the proteins between 55 and 100 kDa where hexamerins were also located in SDS-PAGE gels, were in accordance with the potential proteins absorbed by the fat body (Fig. 1). However, the internalization mechanisms of these proteins had not been investigated. In addressing this question, inhibition of clathrin-dependent, caveolin-dependent, or F-actin activity was performed. The results showed that only inhibition of clathrin-mediated endocytosis or clathrin RNAi caused striking accumulation of 55–100 kDa proteins in the hemolymph, showing that the absorption of these proteins was mainly mediated by clathrin-dependent internalization. In addition, except for the dominant hexamerins, there were ~40 types of proteins at low quantities in both hemolymph and fat body by MS analysis. Among these proteins, apolipophorins, transferrin, fibrinogen and low molecular 30 kDa lipoprotein were previously reported to be transported into cells more or less via clathrin-dependent endocytosis mediated by their receptors (Dantuma *et al.*, 1996; Hung *et al.*, 2012; Fruttero *et al.*, 2014; Rodríguez-Vezquez *et al.*, 2015). Typically, phenoloxidasases, which are presumed to be secreted and released from the fat body, were also identified in both hemolymph and fat body; however, their precise regulatory mechanism is unclear (Chen *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

Possible involvement of storage proteins in fat body homeostasis maintenance during prepupal stage

During larval–pupal metamorphosis, the larval fat body undergoes a series of physiological events to meet the requirements of metamorphosis and maintain intracellular homeostasis (Tian *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). Hexamerins and phenoloxidasases both belong to the hemocyanin protein superfamily; however, these two subtype have distinct functions and display controversial interactions under specific conditions (Rhee *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018). Insect phenoloxidasases are type 3 copper-containing proteins, that can oxidize

substrates and cause melanization, while *B. mori* SP1 is known to mediate anti-oxidative activity in mammalian cell lines, suggesting the potential opposite function of these two subtype proteins (Rhee *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2017). However, in *Circulifer haematocaps*, phenoloxidasase activity is induced by bacterial infection, accompanied by the upregulation of hexamerin transcription. Moreover, RNAi of *hexamerin* resulted in a significant reduction in phenoloxidasase activity, showing the involvement of hexamerin in phenoloxidasase activity (Eliautout *et al.*, 2016). Here, in fat body of *B. mori*, phenoloxidasases, including LOW QUALITY PROTEIN: phenoloxidasase subunit 1-like, phenoloxidasase subunit 1, prophenoloxidasase-2s and phenoloxidasase subunit 2, were all identified. Moreover, apolipophorins, which activate the PPO system, were also identified at this stage, showing the possibility of abnormal melanization activation in the fat body during larval–pupal metamorphosis. Simultaneously, storage proteins, including SP2, SP1, arylphorin, arylphorin subunit beta and basic juvenile hormone-suppressible protein 2, were all absorbed by the fat body from the hemolymph, which might prevent excessive oxidative conditions and maintain the fitness of the fat body. Moreover, apoptosis-related genes are strongly induced during larval–pupal metamorphosis; however, the inhibitor of apoptosis is also upregulated at the same time, showing the inhibition of premature destruction of fat body cells at these stages (Tian *et al.*, 2012). Thus, the absorbed storage proteins are also supposed to inhibit apoptosis by preventing premature destruction and helping to maintain the homeostasis of fat body. In addition to being stores for amino acids, storage proteins are definitely involved in other physiological events and have anti-oxidative and anti-apoptotic functions, and the underlying mechanisms should be further investigated. In conclusion, hexamerins were identified for the first time, and were shown to be absorbed by the fat body from the hemolymph via clathrin-mediated endocytosis during larval–pupal transition, shedding light on the protein-absorption mechanism during insect metamorphosis.

Acknowledgments

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (grants 31472042 and 31672368 to LT, 31702053 to KL and 31702065 to HY) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (grant 2017A030311024 to LT). We acknowledge Prof. Sheng Li from South China

Normal University for fundamental advice on the organization and construction of this work.

Disclosure

The authors have no conflicts of interest.

References

- Arif, A., Manohar, D., Gullipalli, D. and Duttagupta, A. (2008) Regulation of hexamerin receptor phosphorylation by hemolymph protein HP19 and 20-hydroxyecdysone directs hexamerin uptake in the rice moth *Corcyra cephalonica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 307–319.
- Burmester, T. (2002) Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 172, 95–107.
- Burmester, T. and Scheller, K. (1997) Conservation of hexamerin endocytosis in Diptera. *European Journal of Biochemistry*, 244, 713–720.
- Chen, F., Zhu, L.Y., Zhang, Y.L., Kumar, D., Cao, G.L., Hu, X.L. et al. (2018) Clathrin-mediated endocytosis is a candidate entry sorting mechanism for *Bombyx mori* cypovirus. *Scientific Reports*, 8, 7268.
- Da Cruz-Landim, C., Roat, T.C. and Berger, B. (2013) Fat body, hemolymph and ovary routes for delivery of substances to ovary in *Melipona quadrifasciata* anthidioids: differences among castes through the use of electron-opaque tracers. *Microscopy*, 62, 457–466.
- Dantuma, N.P., Van Marrewijk, W.J., Wynne, H.J. and van der Horst, D.J. (1996) Interaction of an insect lipoprotein with its binding site at the fat body. *Journal of Lipid Research*, 37, 1345–1355.
- Dutta, D. and Donaldson, J. G. (2012) Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. *Cellular Logistics*, 2, 203–208.
- Eliatout, R., Dubrana, M. P., Vincent-Monégat, C., Vallier, A., Braquart-Varnier, C., Poirié, M. et al. (2016) Immune response and survival of *Circulifer haematocaps* to *Spiroplasma citri* infection requires expression of the gene hexamerin. *Developmental and Comparative Immunology*, 54, 7–19.
- Feng, M., Zhang, J., Xu, W.F., Wang, H.P., Kong, X.S. and Wu, X.F. (2018) *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus utilizes a clathrin and dynamin dependent endocytosis entry pathway into BmN cells. *Virus Research*, 253, 12–19.
- Fruttero, L.L., Demartini, D.R., Rubiolo, E.R., Carlini, C.R. and Canavoso, L.E. (2014) β -chain of ATP synthase as a lipophorin binding protein and its role in lipid transfer in the midgut of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 52, 1–12.
- Fujii, T., Sakurai, H., Izumi, S. and Tomino, S. (1989) Structure of the gene for the arylphorin-type storage protein SP 2 of *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 11020–11025.
- Geiser, D.L. and Winzerling, J.J. (2012) Insect transferrins: Multifunctional proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820, 437–451.
- Gopalapillai, R., Kadono-Okuda, K., Tsuchida, K., Yamamoto, K., Nohata, J., Ajimura, M. et al. (2006) Lipophorin receptor of *Bombyx mori*: cDNA cloning, genomic structure, alternative splicing, and isolation of a new isoform. *Journal of Lipid Research*, 47, 1005–1013.
- Guo, C.J., Wu, Y.Y., Yang, L.S., Yang, X.B., He, J., Mi, S. et al. (2012) Infectious spleen and kidney necrosis virus (a fish iridovirus) enters Mandarin fish fry cells via caveola-dependent endocytosis. *Journal of Virology*, 86, 2621–2631.
- Guo, S.Y., Wu, W.M., Li, S.Y., Liu, Y., Ruan, Z.F., Ye, M.Q. et al. (2018) 20-Hydroxyecdysone-upregulated proteases involved in *Bombyx* larval fat body destruction. *Insect Molecular Biology*, 27, 724–738.
- Haunerland, N.H. (1996) Insect storage proteins: gene families and receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26, 755–765.
- Huebers, H.A. and Finch, C.A. (1987) The physiology of transferrin and transferrin receptors. *Physiological Reviews*, 67, 520–582.
- Hung, W.S., Huang, C.L., Fan, J.T., Huang, D.Y., Yeh, C.F., Cheng, J.C. et al. (2012) The endocytic adaptor protein Disabled-2 is required for cellular uptake of fibrinogen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823, 1778–1788.
- Kanlaya, R., Sintiprungrat, K., Chaiyarit, S. and Thongboonkerd, V. (2013) Macropinocytosis is the major mechanism for endocytosis of calcium oxalate crystals into renal tubular cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 67, 1171–1179.
- Kumar, A., Srivastava, P., Sirisena, P., Dubey, S.K., Kumar, R., Shrinet, J. et al. (2018) Mosquito innate immunity. *Insects*, 9, 95.
- Levenbook, L. (1985) Insect storage proteins. Comprehensive insect physiology. *Biochemistry and Pharmacology* (eds G.A. Kerkut & L.I. Gilbert), Pergamon Press, Oxford, 307–346.
- Lee, J.H., Baik, J.E. and Rhee, W.J. (2017) Anti-oxidative effects of silkworm storage protein 1 in HeLa cell. *Process Biochemistry*, 55, 199–206.
- Lin, Y., Meng, Y., Wang, Y.X., Luo, J., Katsuma, S., Yang, C.W. et al. (2013) Vitellogenin receptor mutation leads to the oogenesis mutant phenotype “scanty vitellin” of the silkworm. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 13345–13355.
- Li, S., Yu, X. and Feng, Q.L. (2019) Fat body biology in the last decade. *Annual Review of Entomology*, 64, 315–333.

- Lu, A.R., Zhang, Q.L., Zhang, J., Yang, B., Wu, K., Xie, W. *et al.* (2014) Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Frontier Physiology*, 5, 252.
- Myllylä, R., Wang, C., Heikkinen, J., Juffer, A., Lampela, O., Risteli, M. *et al.* (2007) Expanding the lysyl hydroxylase toolbox: New insights into the localization and activities of lysyl hydroxylase 3 (LH3). *Journal of Cellular Physiology*, 212, 323–329.
- Pandey, K.N. (2015) Endocytosis and trafficking of natriuretic peptide receptor-A: potential role of short sequence motifs. *Membranes*, 5, 253–287.
- Rhee, W.J., Park, J.H., Hahn, J.S. and Park, T.H. (2013) Anti-apoptotic mechanism of silkworm hemolymph in HeLa cell apoptosis. *Process Biochemistry*, 48, 1375–1380.
- Rodríguez-Vázquez, M., Vaquero, D., Parra-Peralbo, E., Mejía-Morales, J.E. and Culi, J. (2015) *Drosophila* lipophorin receptors recruit the lipoprotein LTP to the plasma membrane to mediate lipid uptake. *PLoS Genetics*, 11, e1005356.
- Ryan, R.O. and van der Horst D.J. (2000) Lipid transport biochemistry and its role in energy production. *Annual Review of Entomology*, 45, 233–260.
- Sakurai, H., Fujii, T., Izumi, S. and Tomino, S. (1988) Structure and expression of gene coding for sex-specific storage protein of *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 7876–7880.
- Tian, L., Guo, E.E., Diao, Y.P., Zhou, S., Peng, Q., Cao, Y. *et al.* (2010a) Genome-wide regulation of innate immunity by juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone in the *Bombyx* fat body. *BMC Genomics*, 11, 549.
- Tian, L., Guo, E.E., Wang, S., Liu, S.M., Jiang, R.J., Cao, Y. *et al.* (2010b) Developmental regulation of glycolysis by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in fat body tissues of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2, 255–263.
- Tian, L., Liu, S.M., Liu, H.H. and Li, S. (2012) 20-hydroxyecdysone upregulates apoptotic genes and induces apoptosis in the *Bombyx* fat body. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 79, 207–219.
- Tian, L., Ma, L., Guo, E.E., Deng, X.J., Ma, S.Y., Xia, Q.Y. *et al.* (2013) 20-hydroxyecdysone upregulates *Atg* genes to induce autophagy in the *Bombyx* fat body. *Autophagy*, 9, 1172–1187.
- Tooze, S.A., Abada, A. and Elazar, Z. (2014) Endocytosis and autophagy: Exploitation or cooperation? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6, a18358.
- Tsuchida, K., Soulages, J.L., Moribayashi, A., Suzuki, K., Maekawa, H. and Wells, M.A. (1997) Purification and properties of a lipid transfer particle from *Bombyx mori*: comparison to the lipid transfer particle from *Manduca sexta*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1337, 57–65.
- Wang, X.L., Luo, H. and Zhang, R. (2018) Innate immune responses in the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *Developmental & Comparative Immunology*, 83, 22–33.
- Wen, D.H., Luo, H., Li, T.N., Wu, C.F., Zhang, J.H., Wang, X.L. *et al.* (2017) Cloning and characterization of an insect apolipoprotein (apolipophorin-II/I) involved in the host immune response of *Antheraea pernyi*. *Developmental & Comparative Immunology*, 77, 221–228.
- Wu, T.Y., Zhao, Y., Wang, Z.Y., Song, Q.S., Wang, Z.X., Xu, Q.W. *et al.* (2018) β -1,3-Glucan recognition protein 3 activates the prophenoloxidase system in response to bacterial infection in *Ostrinia furnacalis* Guenée. *Developmental & Comparative Immunology*, 79, 31–43.
- Yu, H.Z., Wang, J., Zhang, S.Z., Toufeeq, S., Li, B., Li, Z. *et al.* (2018) Molecular characterisation of *Apolipophorin-III* gene in *Samia cynthia ricini* and its roles in response to bacterial infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 159, 61–70.
- Yun, E.Y., Lee, J.K., Kwon, O.Y., Hwang, J.S., Kim, I., Kang, S.W. *et al.* (2009) *Bombyx mori* transferrin: Genomic structure, expression and antimicrobial activity of recombinant protein. *Developmental & Comparative Immunology*, 33, 1064–1069.

Manuscript received February 28, 2019

Final version received March 17, 2019

Accepted March 18, 2019

Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Table S1 Proteins identified in the hemolymph.

Table S2 Proteins identified in the fat body.

Table S3 Proteins identified in both hemolymph and fat body.

Table S4 Signaling peptides and transmembrane domains predicated in proteins present in both hemolymph and fat body.

Fig. S1 Separation of proteins from hemolymph and fat body for mass spectrum identification.

Total proteins of the hemolymph from wandering and fat body from day one of prepupa (PP1) stages separated by SDS-PAGE gels and stained with Coomassie brilliant blue. The three protein bands between 55 and 100 kDa were cut and submitted for mass spectrum identification.

四、科研成果

1. 科技奖励证书

广东省农业技术推广奖二等奖：桑蚕重大疫病诊断检测关键技术创新、系列产品创制与应用



广东省农业技术推广奖

获奖证书

为表彰在农业技术推广工作中做出贡献
的单位和个人，特颁发此证书，以资鼓励。

获奖项目：桑蚕重大疫病诊断检测关键技术创新、系列
产品创制与应用

奖励等级：二等奖

获 奖 者：易辉玉

奖励日期：2019 年 12 月 10 日

证 书 号：2018-2-X07-R11

广东省农业技术推广奖

评审委员会

五、其他业绩

1. 指导学生参加学科竞赛

1.1 第三届“陌桑杯”全国大学生蚕桑生物技术创新大赛本科生组二等奖：“BmCalpainA4 的克隆表达及活性鉴定”

获奖证书

华南农业大学

证书编号: CSCX20C11004

胡仲贤、罗玉娟、白新宇 同学:

你(们)的作品 《 BmCalpainA4的克隆表达及活性鉴定 》

在第三届“陌桑杯”全国大学生蚕桑生物技术创新大赛中荣获

本科生组 二等 奖

指导教师: 易辉玉、陈榕榕
特颁此证, 以兹鼓励。

承办: 浙江大学动物科学学院 浙江省蚕学会
浙江省蚕峰资源利用与创新重点实验室
协办: 嵊州陌桑高科股份有限公司



五、其他业绩

1. 指导学生参加学科竞赛

1.2 第二届“东方紫杯”全国大学生蚕桑生物技术创新大赛本科生组二等奖：“桑树对罗非鱼养殖水体的净化研究”

获奖证书

华南农业大学

张丹霓 谢育凯 伍道聪 同学：

你(们)的作品 《桑树对罗非鱼养殖水体的净化研究》
在第二届“东方紫杯”全国大学生蚕桑生物技术创新大赛中荣获

本科生组 二等奖

指导教师：易辉玉 黄志君
特颁此证，以兹鼓励。

教育部高等学校动物生产类专业教学指导委员会
家蚕基因组生物学国家重点实验室 (盖章)

承办：西南大学生物科技学院 农业农村部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室 重庆市蚕学会
协办：句容市东方紫蚕业有限公司 南充尚好桑业有限公司 重庆北仑锦顺实业有限公司

二〇一九年十一月

五、其他业绩

2. 个人荣誉

2.1 院级“优秀共产党员”证书

荣誉证书

易辉玉 同志：

在 2023 年“七一表彰”中被评为华南农业大学动物科学学院

优秀共产党员

特发此证，以资鼓励。

中国共产党华南农业大学动物科学学院委员会

2023 年 5 月 31 日

五、其他业绩

2. 个人荣誉

2.2 学院 2021 年度“优秀班主任”

荣誉证书

易辉玉同志：

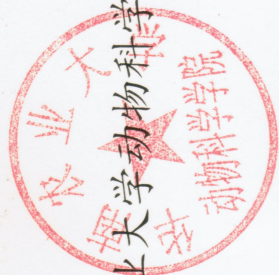
被评为华南农业大学动物科学学院 2021 年度

“优秀班主任”。

特发此证，以资鼓励。

中国共产党华南农业大学动物科学学院委员会 华南农业大学动物科学学院

2022 年 1 月 10 日



五、其他业绩

2. 个人荣誉

2.3 院级 2020 年度“优秀班主任”证书

荣誉证书

易辉玉 同志：

被评为华南农业大学动物科学学院 2020 年度

“优秀班主任”。

特发此证，以资鼓励！

华南农业大学动物科学学院

2021 年 1 月 27 日

