应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2013,50(2):368 - 375. DOI:10.7679/j.issn.2095 - 1353.2013.049

柑橘全爪螨酚氧化酶原激活酶基因 cDNA 克隆及生物信息学分析*

钟 锐 丁天波 廖重宇 张 昆 豆 威 王进军**

(西南大学植物保护学院 昆虫学及害虫控制工程重庆市市级重点实验室 重庆 400716)

摘 要 酚氧化酶原激活酶(prophenoloxidase activating enzyme, PPAE)是酚氧化酶激活系统(prophenoloxidase activating system, PPO-AS)的组成部分,是无脊椎动物抵御入侵微生物的关键酶。本研究利用 RACE 技术从柑橘全爪螨 *Panonychus citri* (McGergor)体内获得一条 *PPAE* 基因全长 cDNA,命名为 *PcPPAE* (GenBank:KC136292),属于丝氨酸蛋白酶家族。该基因 cDNA 全长 1 676 bp,开放阅读框 1 377 bp,编码 458 个氨基酸。该基因编码蛋白预测分子量为 49.9 ku,理论等电点(pI 值)为 5.68,分子式为 $C_{2201}H_{3467}N_{607}O_{678}S_{22}$,不稳定系数为 41.51,总亲水性系数为 -0.268。经序列比对发现该基因具有发夹结构域,丝氨酸蛋白酶结构域,以及丝氨酸蛋白酶结构域中保守的催化三联体。系统发育分析表明该基因与二斑叶螨发夹结构丝氨酸蛋白酶基因的亲缘关系最近。本研究首次从柑橘全爪螨体内克隆获得酚氧化酶原激活酶,为后期进行柑橘全爪螨抵御微生物侵染机制研究奠定了基础。

关键词 柑橘全爪螨,酚氧化酶原激活酶,RACE,生物信息学

Cloning and bioinformatic analysis of the citrus red mite, *Panonychus citri*, prophenoloxidase activating enzyme gene

ZHONG Rui DING Tian-Bo LIAO Chong-Yu ZHANG Kun DOU Wei WANG Jin-Jun**

(Key Laboratory of Entomology and Pest Control Engineering, College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract Prophenoloxidase, a member of the serine proteinase group, is a key enzyme in invertebrates for defense against microbial infections and the prophenoloxidase activating enzyme (PPAE) is an important component of the prophenoloxidase activating system (PPO-AS). A full-length cDNA of the *PPAE* gene named *PcPPAE* (GenBank: KC136292) was cloned from *Panonychus citri* (McGregor) using rapid amplification of cDNA ends (RACE). The cloned gene was 1 676 bp in length with an ORF of 1 377 bp encoding 458 amino acid residues. The protein predicted from the cloned *PcPPAE* had a molecular weight of 49.9 ku and a theoretical isoeletric point (pI) of 5.68. Its predicted molecular formula was $C_{2201}H_{3467}N_{607}O_{678}S_{22}$. Bioinformatic analysis showed that its instability index was 41.51 and its GRAVY was -0.268. The deduced protein *Pc*PPAE had a clip-domain, serine proteinase domain and a conserved catalytic triad in the serine protease domain. Phylogenetic analysis indicates that *Pc*PPAE is most closely related to the clip-domain serine proteinase of *Tetranychus urticae* (Koch). These results provide the basis for further research on defense against microbial infection in the citrus red mite.

Key words *Panonychus citri*, prophenoloxidase activating enzyme (PPAE), RACE, bioinformatic analysis

无脊椎动物的先天免疫系统,例如吞噬作用、成瘤作用、包囊作用、抗菌肽,凝血系统和黑化作用,是宿主抵御微生物侵染的第一道防线(Loker *et al.*,2004;Jiravanichpaisal *et al.*,2006)。酚氧化酶原激活系统(prophenoloxidase activating system, PPO-AS)是无脊椎动物的一种重要的先天免疫机制,其主要包括一些模式识别蛋白(pattern-recognition protein, PRP),酚氧化酶原激活酶

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(201103020);现代柑橘产业技术体系岗位科学家经费项目。

** 通讯作者,E-mail:jjwang7008@yahoo.com

收稿日期:2012-12-06,接受日期:2012-12-28

(prophenoloxidase activating enzyme, PPAE),及酚氧化酶及其酶原(phenoloxidase, PO; prophenoloxidase, PPO)等。当外源微生物侵染宿主时,抗菌肽能特异性的识别微生物表面的某些激活因子,如革兰氏阴性菌的脂多糖,真菌的 β-1,3-葡聚糖和革兰氏阳性菌的肽聚糖等,从而激活酚氧化酶原,在被侵染部位或入侵微生物周围形成、沉积黑色素(Sritunyalucksana and Soderhall, 2000; Cerenius and Soderhall, 2004; Kanost and Gorman, 2008; Labbe and Little, 2009; Rao *et al.*, 2010)。PO 是黑化作用级联系统中的关键酶,在无脊椎动物体内以无活性 PPO 的形式存在(Brookman *et al.*, 1989),经丝氨酸蛋白酶(serine protease)级联反应水解成 PO。PO 能催化酪氨酸(tyrosine)转化成多巴再氧化成多巴醌,多巴醌经非酶促转化产生多巴色素,在多巴色素异构酶作用下产生 5,6-二羟吲哚,进而产生黑色素。酚氧化酶原激活反应过程中产生的高毒性的醌物质和其他活性氧中间体也能直接杀死清除入侵微生物(Nappi and Christensen, 2005; Zhao *et al.*, 2007; Cerenius *et al.*, 2010)。

从无活性的 PPO 激活成具活性的 PO 是通过 PPAE 的水解作用来调节的,PPAE 又被称为酚氧化酶原激活蛋白酶(prophenoloxidase activating proteinase, PAP)或酚氧化酶激活因子(prophenoloxidase activating factor, PPAF)(Cerenius and Soderhall, 2004)。所有的 PPAE 像酶原一样存在,经诱导因子诱导后才具蛋白水解活性,就像是微生物制造、添加了酚氧化酶原激活系统的蛋白组分一样(Cerenius and Soderhall, 2004; Cerenius *et al.*, 2008)。

柑橘全爪螨 *Panonychus citri*(McGergor)又名柑橘红蜘蛛、瘤皮红蜘蛛,属蛛形纲(Arachnida)、蜱螨亚纲(Acari)、叶螨科(Tetranychidae)、全爪螨属(*Panonychus*),是一种世界性的多食性害螨,在我国各柑橘产区均有分布且危害严重。其寄主广泛,除危害柑橘外,还对苹果、桑、桂花、蔷薇等多种植物产生危害。该螨以成螨、若螨、幼螨为害柑橘叶片、嫩梢和果实,严重时引起大量落果,造成重大经济损失。由于其自身免疫的存在,柑橘全爪螨可对外界微生物入侵产生一定抵御作用,在一定程度下降低生物源杀螨剂的施用效果,而国内外针对柑橘全爪螨免疫机制研究尚处于起步阶段。本研究在柑橘全爪螨转录组数据的基础上,通过基因克隆获得了一条 *PPAE* 基因 cDNA 全长,并进行相关生物信息学特性分析,为今后在分子水平上探明 PPAE 在 PPO-AS 中的功能奠定了基础,并在一定程度上推动了柑橘全爪螨免疫调控机理的研究。

1　材料与方法

1.1　材料与主要试剂

供试螨源:柑橘全爪螨于 2012 年采自重庆市北碚区中国柑橘研究所柑橘苗圃园。

主要试剂:RNA 提取试剂盒为 RNeasy © Plus Mico Kit(Qiagen GmbH, Hilden, Germany);DNA 胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司;反转录试剂盒 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit、DNase、PrimeScript© RT Reagent Kit Perfect Real Time、*Taq* 酶、10 × PCR buffer(Mg^{2+} free)、$MgCl_2$ 及 dNTP(2.5 mmol/L)均购自 Takara 公司;pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司;感受态细胞 DH5α 购自北京全式金公司。

1.2 总 RNA 的提取与反转录

取 200 头雌成螨于液氮内速冻,置于研钵中磨碎成细粉,转移入事先用 DEPC 水处理过的离心管中,提取总 RNA,储存于 -80℃保存,具体步骤参加试剂盒说明书。使用 Clontech 公司 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒将总 RNA 分别合成可用于 5′ RACE 和 3′ RACE 扩增的第一链 cDNA 模板,利用特异引物进行 RACE 扩增。并使用 Takara 公司 Primer ScirptTM 1ST Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒将总 RNA 反转录成用于全长验证的普通 cDNA 模板。所制备 cDNA 模板均保存至 -80℃。

1.3　引物设计与合成

搜集柑橘全爪螨转录组数据库中 *PPAE* 基因片段信息,根据所得的 cDNA 片段设计特异性引物,与试剂盒提供的接头引物分别进行 5′端和 3′端扩增,为增强特异性采用巢式 PCR。根据扩增获得的 5′端和 3′端序列设计全长特异性引物用于柑橘全爪螨 *PPAE* 基因的开放阅读框扩增及验证,引物合成由北京华大生物技术有限公司完成。

1.4　RACE 扩增与全长验证

5′RACE 第一轮 PCR 引物组合为试剂盒中的 UPM 与 5GSP1，模板为 5′RACE cDNA 模板，5′RACE 第二轮 PCR 引物组合为试剂盒中 NUP 与 5GSP2，模板为第一轮 PCR 产物，反应体系为：10 × PCR buffer（Mg^{2+} free）2.5 μL，$MgCl_2$ 2 μL，dNTP（2.5 mmol/L）2 μL，模板 1 μL，上下游引物各 1 μL，*Taq* 聚合酶 0.25 μL，加水至 25 μL，混匀，离心，放入 PCR 仪扩增。PCR 反应程序为：95℃预变性 3 min，95℃变性 30 s，53.8℃（第二轮为 59.6℃）退火 30 s，72℃延伸 1 min 30 s，共 34 个循环，72℃延伸 10 min。3′ RACE 扩增方法同 5′ RACE，引物信息见表 1。全长验证以普通 cDNA 为模板，PPAEf 和 PPAEr 分别作为上下游引物，PCR 程序同 RACE 扩增程序。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，回收目的片段。

表 1 柑橘全爪螨 *PPAE* 基因 cDNA 克隆所用引物

Table 1 Primers used in the cDNA cloning of *PPAE* from *Panonychus citri*

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequence	退火温度 Annealing temperature	用途 Purpose
5GSP1	GTTGGTTGTGGTCTTGGT	53.9℃	PPAE cDNA 5′ end
5GSP2	TTCCCTCTTCACTTCCATTCTCAC	63.0℃	
3GSP1	TTACTTCGTGTTCCATCTTG	53.8℃	PPAE cDNA 3′ end
3GSP2	TGGGGCAACTTTGGTCTC	59.6℃	
PPAEf	CGGAAAGAATGAGAATCG	54.2℃	PPAE cDNA ORF
PPAEr	CCTCTTCACTATTCAAGGTTCT	54.4℃	

1.5 PCR 产物克隆、鉴定及测序

PCR 产物经胶回收试剂盒回收纯化后，连接至 pGEM-T Easy 载体，转化到感受态大肠杆菌 DH5α 中。经蓝白斑筛选，随机挑取多个单一的白色菌落扩大培养，PCR 菌液鉴定阳性克隆送至北京华大生物技术有限公司测序。

1.6 序列分析

采用 DNAMAN 6.0 对测序结果进行编辑，并对推导的氨基酸序列进行同源比对。通过 MEGA 5.04 中的邻接法（Neighbor-Joining）构建系统发育树，各分支均进行 1 000 次的重复检验，二斑叶螨参考序来自 BIOINFORMATICS & SYSTEMS BIOLOGY（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/bogas/overview/Tetur），其余物种序列均来自 NCBI 数据库（http://www.nibi.nlm.nih.gov）。使用 SignalP 4.0 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）进行信号肽分析，并采用 ProtParam（http://web.expasy.org/protparam/）进行蛋白质理化性质预测。蛋白质翻译后修饰的糖基化位点和磷酸化位点分别采用 DictyOGlyc 在线软件（http://www.cbs.dtu.dk/services/DictyOGlyc/）和 NetPhos2.0 Sever（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/）分析。使用 TMHMM Server v.2.0 软件分析跨膜区，使用 NCBI 的 Conserved Domain Search 在线工具（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）进行保守结构域预测。

2 结果与分析

2.1 柑橘全爪螨总 RNA 提取

采用核酸浓度测定仪测定了柑橘全爪螨雌成螨体内提取所得总 RNA 的纯度和浓度，其 OD_{260}/OD_{280} 的比值为 2.125；OD_{260}/OD_{230} 的比值为 2.061，总 RNA 浓度为 1 175 μg/mL。琼脂糖凝胶电泳结果显示：18S RNA 和 28S RNA 条带清晰，说明提取的总 RNA 是完整的，纯度较好。

2.2 柑橘全爪螨 *PPAE* 基因的 cDNA 序列分析

通过 RACE 方法克隆获得柑橘全爪螨一个 *PPAE* 基因的全长 cDNA（命名为 *PcPPAE*，GenBank 登录号为 KC136292），序列总长度为 1 676 bp，开放阅读框（opening reading frame，ORF）长度为 1 377 bp，5′ 端非编码区 189 bp，3′ 端非编码区 110 bp（图 1）。

2.3 *Pc*PPAE 氨基酸序列保守结构域及系统发育分析

选取包括柑橘全爪螨在内的 5 个物种的

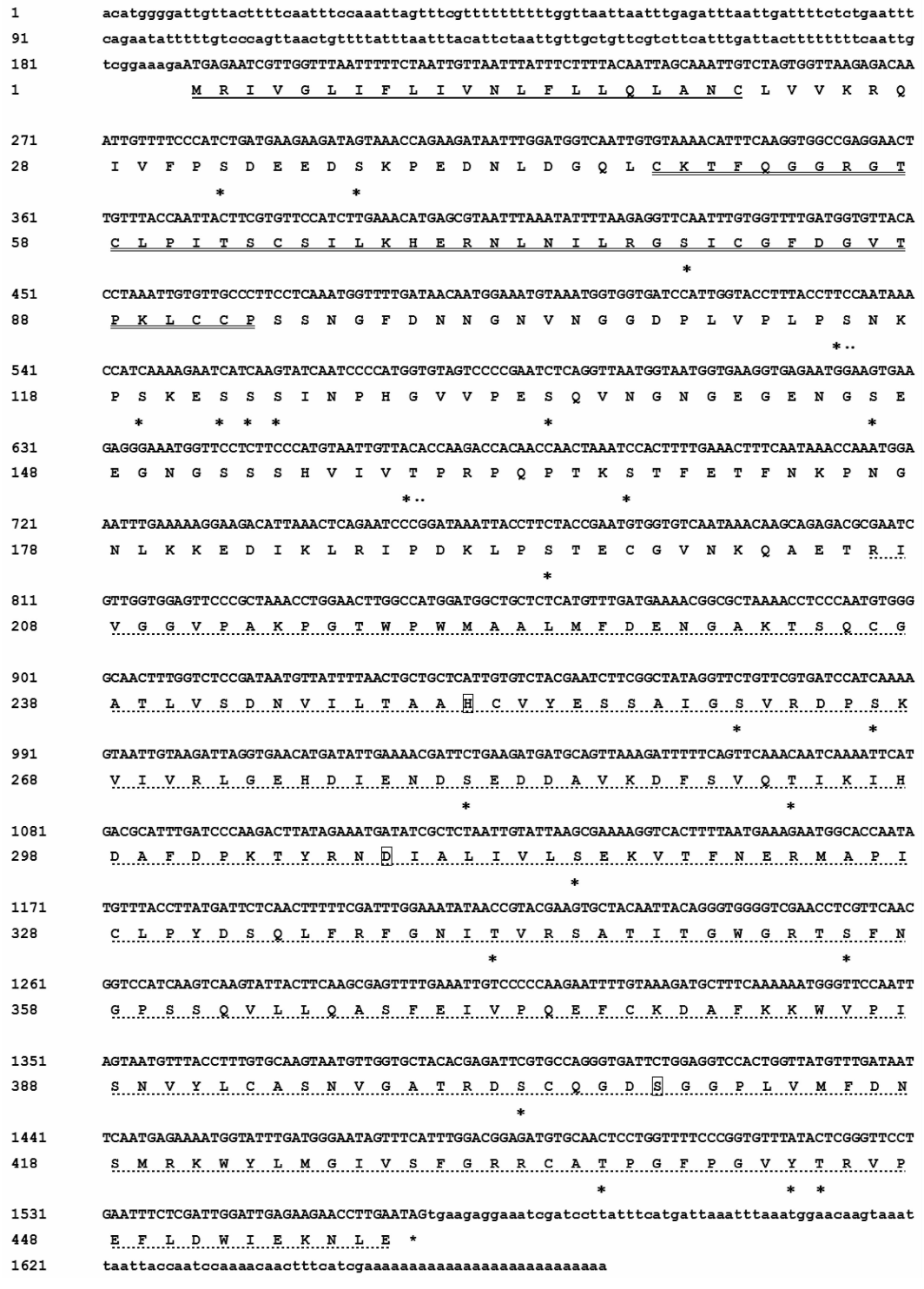

图 1　柑橘全爪螨 *PPAE* 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1　The cDNA and deduced amino acid sequence of *PPAE* in *Panonychus citri*

图中起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG 加粗,* 表示对应核苷酸序列是终止密码子,下划线表示信号肽,保守的催化三联体(H,D,S)用方框表示,双下划线表示发夹结构域,下滑虚线表示丝氨酸蛋白酶结构域,·· 表示糖基化位点,* 表示磷酸化位点。

The initial codon ATG and termination codon TAG are indicated in bold. * indicates that corresponding nucleotide sequence and amino acid sequence. The predicated signal peptide is underlined (single line). The conserved catalytic triad (H,D,S) is framed with rectangle. The clip-domain is underlined (double line). The serine proteinase domain is undelined (dotted line). ·· indicates the glycosylation site; * indicates the phosphorylation site.

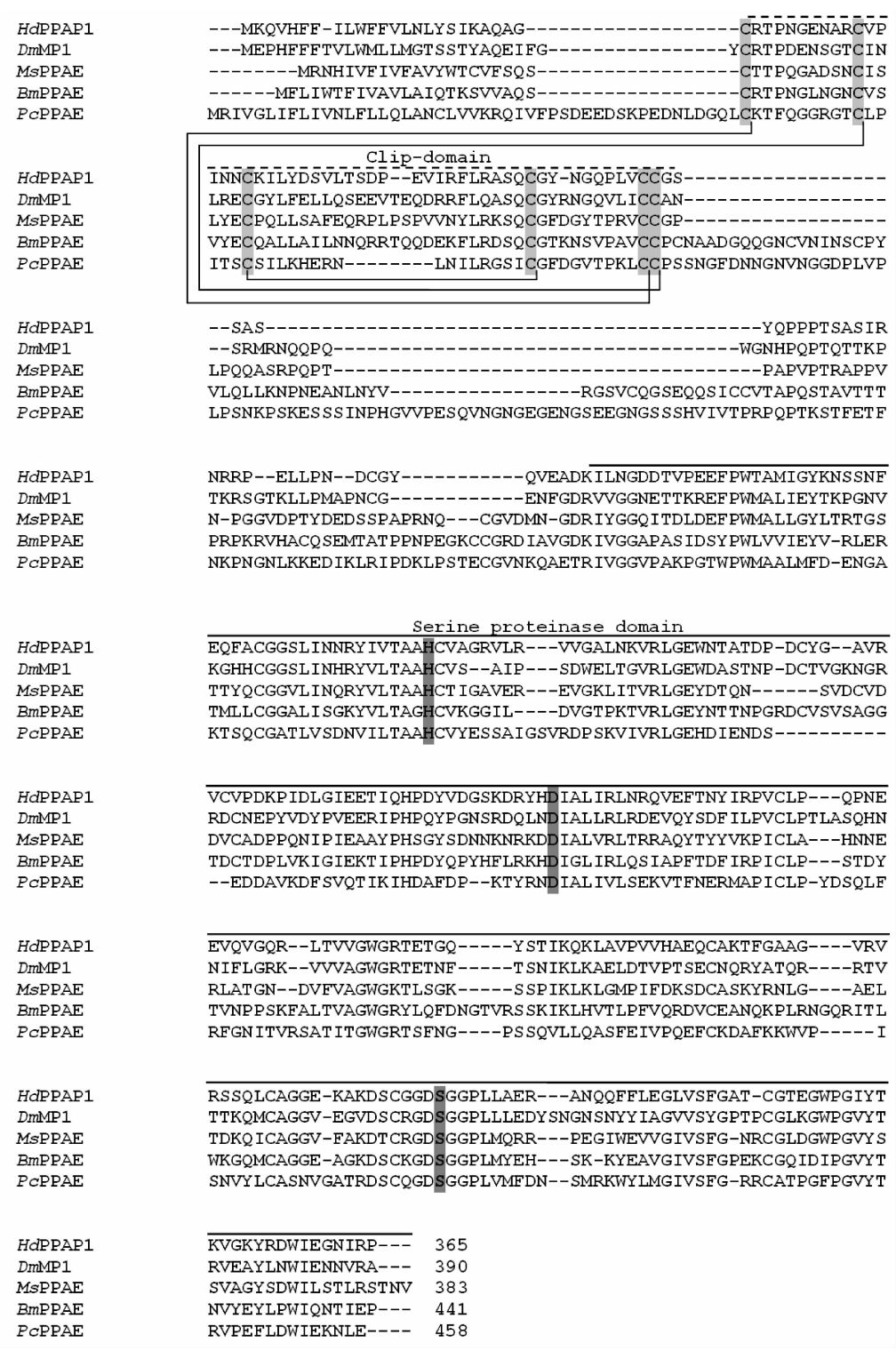

图 2 *Pc*PPAE 与其他物种氨基酸序列多重比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment between *Pc*PPAE and the predicted amino acid sequences of other species

发夹结构域中的二硫键用线连接 the disulfide linkages are shown in black lines. 所用序列 GenBank 登录号 GenBank accession number：东北大黑鳃金龟 *Holotrichia diomphalia* pro-phenoloxidase activating enzyme 1 precursor（*Hd*PPAF1：AB013088），黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* melanization protease 1（*Dm*MP1：NM_141193），烟草天蛾 *Manduca sexta* prophenoloxidase activating enzyme precursor（*Ms*PPAE：AF059728），家蚕 *Bombyx mori* prophenoloxidase activating enzyme（*Bm*PPAE：NM_001043367），柑橘全爪螨 *Panonychus citri* prophenoloxidase activating enzyme（*Pc*PPAE：KC136292）.

PPAE 氨基酸序列,使用 DNAMAN 软件进行多重序列比对,并对重要的结构区域进行分析,发现序列中存在由组氨酸(His,H),天冬氨酸(Asp,D)和丝氨酸(Ser,S)组成的催化三联体(catalytic triad)保守激活位点(图 2)。通过使用 NCBI 的 Conserved Domain Search 在线软件分析发现,该序列的 48 ~93 位为发夹结构域,206 ~458 位为丝氨酸蛋白酶结构域,证明 *PcPPAE* 基因属于丝氨酸蛋白酶(clip-domain serine proteinase, clip-SP)家族(图 2)。DNAMAN 多重比对结果表明,其与二斑叶螨的丝氨酸蛋白酶(含发夹结构域)序列同源性最高,达 68.10%,同样比对发现其与西方盲走螨 *Metaseiulus occidentalis* 的序列一致性为 33.68%。用 MEGA 5.04 中的邻接法构建系统发育树,发现其与二斑叶螨 clip-SP 家族蛋白同源性最高(图 3)。

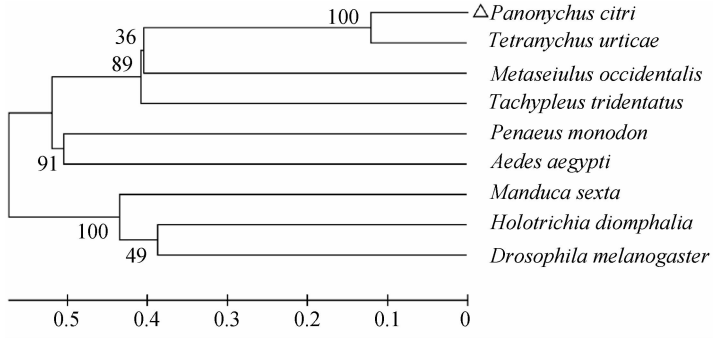

图 3　柑橘全爪螨 PPAE 的系统发育树

Fig. 3　Phylogenetic analysis of PPAEs from *Panonychus citri* and other species

所用序列 GeneBank 登录号 GeneBank accession number:柑橘全爪螨 *Panonychus citri*(KC136292),中华鲎 *Tachypleus tridentatus*(AAA30094),斑节对虾 *Penaeus monodon*(ACP19558),埃及伊蚊 *Aedes aegypti*(XP_001662898),烟草天蛾 *Manduca sexta*(AF059728),东北大黑鳃金龟 *Holotrichia diomphalia*(AB013088),黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*(NM_141193),西方盲走螨 *Metaseiulus occidentalis*(XP_003740553);BIOINFORMATICS & SYSTEMS BIOLOGY 登录号:二斑叶螨 *Tetranychus urticae*(tetur09g00280).

2.4　*Pc*PPAE 蛋白基本理化性质预测分析

使用 ProParam 在线分析软件预测 *Pc*PPAE 的基本理化性质,发现此蛋白包括 458 个氨基酸,分子量为 49.9 ku,理论等电点(pI 值)为 5.68,预测分子式为 $C_{2201}H_{3467}N_{607}O_{678}S_{22}$。不稳定系数为 41.51,说明其为不稳定蛋白,总亲水性系数为 -0.268,为亲水性蛋白。利用 SignalP 4.0 Server,发现信号肽位于 1 ~21 位。采用 DictyOGlyc 在线软件分析,该基因有位于 115 位的丝氨酸(Ser,S)和位于 159 位的苏氨酸(Thr,T)2 个糖基化位点,采用 NetPhos 2.0 Server 在线软件分析,有 24 个磷酸化位点,为 18 个丝氨酸(S),5 个苏氨酸(T)及 1 个酪氨酸(Tyr,Y)(图 1)。使用 TMHMM Server v. 2.0 软件进行其跨膜区分析,推测此蛋白不含跨膜区。

3　讨论

酚氧化酶原激活系统是节肢动物抵御微生物或寄生物的重要免疫反应(Sritunyalucksana and Soderhall, 2000; Cerenius and Soderhall, 2004; Kanost and Gorman, 2008; Labbe and Little, 2009; Rao *et al.*, 2010)。PPAE 的转录与表达水平,会直接对 PO 产生影响(Zou *et al.*, 2005)。丝氨酸蛋白酶系是蛋白水解酶中最大的家族之一,部分丝氨酸蛋白酶在酚氧化酶原活化作用中起到关键作用。PPAE 属于具发夹结构域的丝氨酸蛋白酶家族,在 N 端含有具调控作用的发夹结构,在 C 端具胰蛋白酶样结构域(trypsin-like domain)(Piao *et al.*, 2005)。在丝氨酸蛋白酶结构域中包含有由组氨酸、天冬氨酸和丝氨酸组成的催化三联体激活位点,它们在酰基的转移机制中发挥作用(Amparyup *et al.*, 2010)。有研究表明,一些具发夹结构域的丝氨酸蛋白酶是调控酚氧化酶原激活酶级联反应所必须的(Jiang and Kanost, 2000; Barillas-Mury, 2007; Jang *et al.*, 2008)。目前一些节肢动物的 *PPAE* 基因已经得到研究,例如斑节对

虾、烟草天蛾、东北大黑鳃金龟、家蚕等(Satoh *et al.*,1999; Kim *et al.*,2002; Gupta *et al.*,2005; Charoensapsri *et al.*,2009)。然而,对蜱螨目酚氧化酶原激活系统的研究尚未见报道。

罗氏沼虾 *Macrobrachium rosenbergii* 的 *PPAE* Ⅲ基因含有 22 个氨基酸的信号肽,存在发夹结构域以及丝氨酸蛋白酶结构域(Arockiaraj *et al.*, 2012),在已报道的斑节对虾 *Penaeus monodon* 的 *PPAE2* 基因中,也包含有由 3 对保守的二硫键连接而成的发夹结构域(Charoensapsri *et al.*,2011)。在本研究中得到的柑橘全爪螨酚氧化酶原激活酶基因中也包含类似结构,即由起始 21 个氨基酸组成的信号肽,由 46 个氨基酸组成的发夹结构域,由 252 个氨基酸组成的丝氨酸蛋白酶结构域,以及发夹结构域中的 3 对二硫键(图 3)。

本研究利用转录组数据,采用 RACE 技术首次以柑橘全爪螨为材料,克隆获得一条酚氧化酶原激活酶的 cDNA 全长序列。序列分析及保守结构域比对表明其属于丝氨酸蛋白酶家族,从系统发育树分析结果可以看出,*PcPPAE* 与同属于叶螨科的二斑叶螨丝氨酸蛋白酶(含发夹结构)基因的亲缘关系最近,推测这两个基因可能具备相似的功能。鉴于 PPAE 是 PO 激活过程中的关键酶,本研究获得的柑橘全爪螨 *PPAE* 基因序列信息,可为后期研究柑橘全爪螨免疫机制奠定基础,将对叶螨科酚氧化酶相关研究起到积极的指导作用。

参考文献(References)

Amparyup P, Wiriyaukaradecha K, Charoensapsri W, Tassankajon A, 2010. A clip domain serine proteinase plays a role in antibacterial defense but is not required for prophenoloxidase activation in shrimp. *Dev. Comp. Immunol.*, 34(2):168 – 176.

Arockiaraj J, Easwvaran S, Vanaraja P, Singh A, Othman RY, Bhassu S, 2012. Prophenoloxidase activating enzyme-III from giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: characterization, expression and specific enzyme activity. *Mol. Biol. Rep.*, 39(2):1377 – 1386.

Barillas-Mury C, 2007. CLIP proteases and *Plasmodium melanization* in *Anopheles gambiae*. *Trends Parasitol.*, 23(7):297 – 299.

Brookman JL, Ratclife NA, Rowey AF, 1989. Studies on the activation of the prophenoloxidase system of insects by bacterial cell wall components. *Insect Biochem.*, 19(1):47 – 57.

Cerenius L, Soderhall K, 2004. Theprophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.*, 198: 116 – 126.

Cerenius L, Babu R, Soderhall K, Jiravanichpaisal P, 2010. *In vitro* effects on bacterial growth of phenoloxidase reaction products. *J. Invertebr. Pathol.*, 103(1):21 – 23.

Cerenius L, Lee BL, Soderhall K, 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.*, 29(6):263 – 271.

Charoensapsri W, Amparyup P, Hirono I, Aoki T, Tassanakajon A, 2009. Gene silencing of a prophenoloxidase activating enzyme in the shrimp *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection. *Dev. Comp. Immunol.*, 33(7):811 – 820.

Charoensapsri W, Amparyup P, Hirono I, Aoki T, Tassanakajon A, 2011. PmPPAE2, a new class of crustacean prophenoloxidase (proPO)-activating enzyme and its role in PO activation. *Dev. Comp. Immunol.*, 35(1):115 – 124.

Gupta S, Wang Y, Jiang H, 2005. *Manduca sexta* prophenoloxidase (proPO) activation requires proPO-activating proteinase (PAP) and serine proteinase homologs (SPHs) simultaneously. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(3):241 – 248.

Jang IH, Nam HJ, Lee WJ, 2008. CLIP-domain family serine proteases in *Drosophila* innate immunity. *BMB Rep.*, 41(2):102 – 107.

Jiang H, Kanost MR, 2000. Theclip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30(2):95 – 105.

Jiravanichpaisal P, Lee BL, Soderhall K, 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211(4): 213 – 236.

Kanost MR, Gorman MJ, 2008. Phenoloxidases in insect immunity//Beckage NE (ed.). Insect Immunology. Academic Press Inc., San Diego. 69 – 96.

Kim MS, Baek MJ, Lee MH, Park JW, Lee SY, Soderhall K, Lee BL, 2002. A neweaster-type serine protease cleaves a Masquerade-like protein during prophenoloxidase activation in *Holotrichia diomphalia* larvae. *J. Biol. Chem.*, 277(42):39999 – 40004.

Labbe P, Little TJ, 2009. ProPhenolOxidase in *Daphnia magna*: cDNA sequencing and expression in relation to resistance to pathogens. *Dev. Comp. Immunol.*, 33(5): 647 – 680.

Loker ES, Adema CM, Zhang SM, Kepler TB, 2004. Invertebrate immune system-not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunol. Rev.*, 198:10 – 24.

Nappi AJ, Christensen BM, 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(5):443 – 459.

Piao S, Song YL, Kim JH, Park JW, Lee BL, Oh BH, Ha NC, 2005. Crystal structure of a clip-domain serine protease and functional roles of the clip domains. *EMBO J.*, 24(24):4404 – 4414.

Rao XJ, Ling E, Yu XQ, 2010. The role of lysozyme in the prophenoloxidase activation system of *Manduca sexta*: an *in vitro* approacj. *Dev. Comp. Immunol.*, 34(3):264 – 271.

Satoh D, Horii A, Ochiai M, Ashida M, 1999. Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm *Bombyx mori*: purification, characterization, and cDNA cloning. *J. Biol. Chem.*, 274(11):7441 – 7453.

Sritunyalucksana K, Soderhall K, 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, 191(1):53 – 69.

Zhao P, Li J, Wang Y, Jiang H, 2007. Broad-spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated in vitro by *Manduca sexta* phenoloxidase. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(9):952 – 959.

Zou Z, Wang Y, Jiang H, 2005. *Manduca sexta* prophenoloxidase activating proteinase-1 (PAP-1) gene: organization, expression, and regulation by immune and hormonal signals. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(6):627 – 636.