



白旭, 冯嘉伟, 白新宇, 李庆荣, 钟仰进, 杨婉莹. 高低温催青温度敏感期家蚕卵的差异蛋白筛查 [J]. 环境昆虫学报, 2023, 45 (4): 997–1008.

高低温催青温度敏感期家蚕卵的差异蛋白筛查

白旭¹, 冯嘉伟¹, 白新宇¹, 李庆荣², 钟仰进¹, 杨婉莹^{1*}

(1. 华南农业大学动物科学学院, 广东省农业动物基因组学与分子育种重点实验室, 广州 510642;

2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广州 510610)

摘要: 滞育 (Diapause) 是昆虫发育停滞或减缓的生理状态, 家蚕 *Bombyx mori* 作为卵滞育的代表, 其滞育过程已得到广泛研究, 但诱导滞育发生的分子机制尚不清楚。二化性家蚕滞育性由遗传和母系在胚胎期所处的环境条件决定, 25℃ 催青蚕卵孵化后的家蚕产滞育卵, 15℃ 低温催青则诱导家蚕产下非滞育卵。本研究分别用 25℃ 和 15℃ 催青蚕卵, 在发生滞育诱导的温度敏感期取样, 抽提蛋白质通过非标 (Label-free) 蛋白质组定量技术进行质谱测序。筛选出具有明显表达差异的蛋白 104 个, 其中 56 个蛋白上调, 48 个蛋白下调。通过生物信息学对差异蛋白进行 GO 分类和 KEGG 功能富集分析, 结果显示差异蛋白主要参与生长发育、物质代谢和胁迫应答等生物过程; 同时差异蛋白主要参与胰岛素信号通路、乙醛酸和二羧酸代谢等相关途径。分别选取上调基因和下调基因进行 qRT-PCR 验证, 其趋势与蛋白组学结果一致。该研究将为进一步解析家蚕滞育诱导发生机制提供靶标蛋白和数据参考。

关键词: 家蚕; 滞育; 温度敏感期; 差异蛋白

中图分类号: Q965; S89

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2023) 04-0997-12

Differential protein screening of silkworm eggs in temperature-sensitive period of high and low temperature

BAI Xu¹, FENG Jia-Wei¹, BAI Xin-Yu¹, LI Qing-Rong², ZHONG Yang-Jin¹, YANG Wan-Ying^{1*}

(1. College of Animal Science, South China Agricultural University/Agricultural Animal Genomics and Molecular Breeding Laboratory of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China; 2. Institute of Sericulture and Agricultural Products Processing, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China)

Abstract: Diapause is a physiological state of stagnation or retardation of insect development. *Bombyx mori*, as the representative of egg diapause, its diapause process has been widely studied, but the molecular mechanisms that induce diapause are still unclear. The diapause of bivoltine silkworm is determined by genetic and matriarchal in embryonic period environment condition, 25℃ after incubation eggs hatch of silkworm production diapause eggs, 15℃ induction of silkworm lay non-diapause eggs. In this study, the eggs were incubated at 25℃ and 15℃ respectively, and the samples were taken during the temperature-sensitive period of diapause induction. The extracted proteins were sequenced by mass spectrometry using label-free proteome quantitative technology. 104 proteins with obvious expression

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金 (2021A1515012090)

作者简介: 白旭, 男, 1993 年生, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生物学, E-mail: 992374063@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 杨婉莹, 女, 博士, 副教授, 研究方向为蚕桑基因组与蛋白, E-mail: emilyyyw@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2022-04-02; 接受日期 Accepted: 2022-07-22

differences were screened, among which 56 proteins were up-regulated and 48 proteins were down-regulated. GO classification and KEGG functional enrichment analysis of the differential protein expression by bioinformatics showed that differential proteins were mainly involved in biological processes such as growth and development, material metabolism and stress response. Differential protein expression were mainly involved in the insulin signaling pathway, glyoxylic acid and dicarboxylic acid metabolism and other related pathways. Up-regulated genes and down-regulated genes were selected for qRT-PCR verification, and the trend was consistent with proteomics results. The results will provide target proteins and data references for further analysis of the mechanism of diapause induction in silkworm.

Key words: Silkworm; diapause; temperature-sensitive period; differential protein expression

滞育 (Diapause) 是昆虫对外界环境变化做出的对策, 在漫长的进化过程中, 该机制保护昆虫渡过不利环境并保证了种族繁衍 (柴华等, 2019; Zhang *et al.*, 2019)。根据昆虫滞育发生阶段的不同, 可分为卵滞育、幼虫滞育、蛹滞育以及成虫滞育 (徐卫华, 2008)。家蚕 *Bombyx mori* 是卵滞育昆虫的典型代表, 也是最早开展滞育研究的模式昆虫。滞育诱导和滞育解除机理的应用对蚕业生产有非常重要的推动作用。

家蚕滞育由滞育激素 (Diapause hormone, DH) 调控, DH 由咽下神经节 (Subesophageal ganglion, SG) 的 12 个神经细胞合成, 再由心侧体至咽侧体释放到血淋巴中 (Kunio *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1995; Hayakawa *et al.*, 1998)。DH 被卵巢上的滞育激素受体 (Diapause hormone receptor, DHR) 识别后, 作为 G 蛋白偶联受体的 DHR 促使卵巢细胞内第二信使鸟苷酸环化酶 (cAMP) 活性下降 (Homma *et al.*, 2006), 导致血液中的海藻糖被分解为葡萄糖。葡萄糖就如卵母细胞中的糖原, 最后在滞育卵中被转化为山梨醇和甘油。这些物质帮助蚕卵抵御低温等不良环境 (Chino, 1958; Yasuhiro *et al.*, 2000)。

二化性家蚕滞育的发生主要受基因和外界环境的影响。蚕卵在 25℃ 长光照下催青时, 其产下的子代卵是滞育卵; 当蚕卵在 15℃ 短光照下催青时, 产下的子代为非滞育卵, 可以正常发育 (Noguchi *et al.*, 2001)。Sato 等 (2014) 研究发现家蚕瞬时受体电位通道蛋白 BmTrpA 在高于 21℃ 时被激活表达, 继而通过未知的方式激活 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 信号系统和黑化诱导神经肽 (corazonin) 级联系统, 通过调节滞育激素释放诱导子代滞育 (Tsuchiya *et al.*, 2020)。也有研究发现激素控制、生物节律和瞬时电位通道等途径也参与了家蚕滞育调控

(Clapham, 2003; Huang, 2004)。说明家蚕滞育发生是一个非常复杂的过程, 其具体机制还在不断探索研究中。

随着家蚕全基因组测序的完成和蛋白表达图谱的建立, 家蚕组学研究发展迅速。Lanfen 等 (2018) 通过液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 对家蚕产下的滞育卵和非滞育卵进行数据分析, 从滞育卵和非滞育卵中鉴定出 309 个共有蛋白质。陈艳荣 (2019) 分别对产滞育卵和产非滞育卵的雌蛹进行转录组测序, 鉴定出滞育相关基因 *akr2e-like*, 将其敲除后, 25℃ 催青的雌蚕产下部分非滞育卵, 证明该基因参与滞育调控。为了研究高低温诱导家蚕滞育发生的分子机制, 本研究用 25℃ 和 15℃ 分别催青蚕卵, 按照 Xu 等 (1995) 建立的催青方法, 在蚕卵发育到温度敏感期时取样, 抽提蚕卵蛋白通过 LC-MS/MS 技术进行蛋白质测序, 筛选出差异表达的蛋白质, 并结合数据库对差异蛋白进行功能分类和功能富集, 为进一步解析温度诱导家蚕滞育发生的分子机理提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 家蚕

供试家蚕二化性品种 P50 由中国科学院蚕业研究所徐安英研究员提供, 幼虫在温度 $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 相对湿度 $60\% \pm 5\%$, 12 h 日夜交替的环境下用新鲜桑叶饲养。

1.2 试剂

SDS、BSA、Tris、二乙醇胺、尿素等购自广州翔博生物科技有限公司; BCA 法蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。蛋白酶抑制剂、TCA、Triton X-100、TSA、NAM、TEAB、二硫苏糖醇 DTT、碘乙酰胺 (IAA) 购自上海蓝木

化工有限公司。RNAex Pro RNA 提取试剂、Evo M-MLV 反转录试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司。qPCR SYBR Green Master Mix 购自上海翌圣生物科技股份有限公司。

1.3 蚕卵催青处理

按照宋宇航等 (2022) 的方法, 将二化性家蚕品种 P50 的蚕卵放在 25℃ 催青, 饲喂 1 代后产下滞育卵。将产下的滞育卵放置 20 h 后进行浸酸处理, 在比重 1.075 (115°F) 的盐酸溶液中浸泡 270 s, 随即放在流动的水中浸泡 30 min, 冲洗干净后放置在 25℃ 晾干。将解除滞育的蚕卵分成两组, 1 组放置于 25℃ 气候箱中催青 (高温滞育诱导组), 另一组放置于 15℃ 气候箱中催青 (低温非滞育诱导组)。分别在蚕卵发育至反转终了期即 23 期时取样, 将蚕卵在液氮中速冻后放入 -80℃ 冰箱。

1.4 蚕卵蛋白质的抽提

从 -80℃ 取出蚕卵, 加液氮充分研磨至粉末。各组样品分别加入粉末 4 倍体积裂解缓冲液 (1% Triton X-100, 1% 蛋白酶抑制剂, 3 μmol/L TSA, 50 mmol/L NAM), 超声裂解。4℃, 12 000 g 离心 10 min, 去除细胞碎片, 上清液转移至新的离心管, 利用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度测定。

1.5 蛋白质电泳检测

制样: 根据蛋白浓度测定结果, 每个样品取等量蛋白到离心管中, 加入 5 μL 的 4 × Loading buffer, 再加入 2% SDS 使总体积为 20 μL; 上样: 依次上样 1 μL 预染蛋白 marker 和 20 μL 蛋白样品; 电泳: 按照 15 mA/gel 的电流跑浓缩胶, 约 15 min 后蛋白浓缩为一条线; 用 35 mA 跑分离胶直至电泳到胶底部; 染色和脱色: 将凝胶取出后于考马斯亮蓝 R-250 染液中室温染色 2 h, 然后加入脱色液, 脱色至背景无色、条带清晰。

1.6 胰酶酶解

取等量蛋白样品, 用裂解液将体积调整浓度一致。缓慢加入终浓度 20% TCA, 涡旋混匀, 4℃ 沉淀 2 h。4 500 g 离心 5 min, 弃上清, 用预冷的丙酮洗涤沉淀 2~3 次。晾干沉淀后加入终浓度 200 mmol/L TEAB, 超声波打散沉淀, 以蛋白酶: 蛋白 = 1 : 50 的比例 (m/m) 加入胰蛋白酶, 酶解过夜。加入 DTT 使其终浓度为 5 mmol/L, 56℃ 还原 30 min, 然后加入 IAA 使其终浓度为 11 mmol/L, 室温避光孵育 15 min。

1.7 液相色谱-质谱联用分析

肽段用液相色谱流动相 A 相溶解后使用 NanoElute 超高效液相系统进行分离。流动相 A 为含 0.1% 甲酸和 2% 乙腈的水溶液; 流动相 B 为含 0.1% 甲酸和 100% 乙腈溶液。液相梯度设置: 0~70 min, 6%~24% B; 70~84 min, 24%~35% B; 84~87 min, 35%~80% B; 87~90 min, 80% B, 流速维持在 450 nL/min。肽段经由超高效液相系统分离后被注入 Capillary 离子源中进行电离然后进 timsTOF Pro 质谱进行分析。离子源电压设置为 1.65 kV, 肽段母离子及其二级碎片都使用高分辨的 TOF 进行检测和分析。二级质谱扫描范围设置为 100~1 700。数据采集模式使用平行累积串行碎裂 (PASEF) 模式。一张一级质谱采集后进行 10 次 PASEF 模式采集母离子电荷数在 0~5 范围内的二级谱图, 串联质谱扫描的动态排除时间设置为 30 s 避免母离子的重复扫描。

1.8 差异蛋白转录水平验证

将蚕卵样品置于液氮预冷的研钵中研磨为粉末, 使用 Trizol 沉淀法提取样本 RNA, 经过去基因组 DNA 反应和反转录得到 cDNA。使用 Primer-BLAS 网站设计目的基因的 qRT-PCR 引物 (引物序列如表 1 所示), 由生工生物公司合成。荧光定量 PCR 方法参照试剂 SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) 操作说明进行。

2 结果与分析

2.1 家蚕胚胎发育进度观察

家蚕的胚胎期被划分为 30 个发育阶段, Xu 等 (1995) 通过温度交换催青实验发现, 在蚕卵胚胎发育的第 20~23 阶段, 即器官形成期的头胸分节期、反转期、反转终了期、毛瘤发生期时对温度诱导最为敏感。只要在蚕卵发育的 20~23 阶段保持 25℃ 催青, 94% 的子代卵为滞育卵, 第 20~25 阶段保持 25℃ 催青, 则子代 97% 为滞育卵。说明家蚕胚胎发育的第 20~25 阶段是感受温度变化诱导子代进入滞育的窗口期, 20~23 阶段是关键期, 因此本实验取 23 阶段即反转终了期的蚕卵进行蛋白质质谱分析。为确保两组蚕卵样本处在同一发育阶段, 通过观察胚胎形态来监控蚕卵的发育进程。图 1 为 15℃ 催青组和 25℃ 催青组蚕卵胚胎, 可以看出取样时两组蚕卵都发育到了第 23 阶段。

表 1 差异表达蛋白基因的引物序列

Table 1 Primer sequences for genes with differentially expressed proteins

基因 Genes	引物序列 Primer (5'→3')
<i>L-lactate dehydrogenase</i>	F: ACTTCCTGGGCTATCGGACT R: AAGTTCGGTTAGAGGCTGGC
<i>Diphthine methyl ester synthase</i>	F: GAGCGCCTGACCAAAGGATA R: GCGGATGTAAATTGGGAGCG
<i>Uricase</i>	F: TACGCTAAGCCCTCAAGCAC R: ACTTTTGCCGTATCCGTGTT
<i>Sericotropin</i>	F: CGCTCTGGCTAAAGTGCCTA R: CTTCGGGTCTTTCTCGTGTT
<i>Deoxyhypusine synthase</i>	F: TGTGCTATTGGGCTTGGAGG R: GGGACGCTTAAACGAGTGGA
<i>Juvenile hormone binding protein</i>	F: TAAAGCGAAAACGGTGCTGC R: ATCGGCCGTGTAAAGTCCTG
<i>UDP-glucose 4-epimerase</i>	F: ATATCCACGTGTGCGACCTC R: GAGTAACCAGTGCCCGTACC
<i>Aminopeptidase</i>	F: TTTGCGAAAAGCCGATCCCCA R: TGGACGAAGCTGTGTAGCTG
<i>Antennal-specific protein</i>	F: ACACCATTGCAACCAACTGC R: TGTGCGAAATCAGCACGGTGT



15℃ 催青组

25℃ 催青组

图 1 反转期家蚕胚胎

Fig. 1 Embryo in reversal period of *Bombyx mori*

2.2 蚕卵蛋白浓度测定及电泳检测

蚕卵蛋白抽提完成后,使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,根据标准曲线和使用的样品体积计算出样品的蛋白浓度(表 2)。

通过 SDS-PAGE 电泳检测抽提蛋白质量,每个样品取 15 μg 进行电泳。结果如图 2 所示,25℃ 和 15℃ 催青组的蚕卵蛋白条带清晰,分布正常均一,蛋白无降解,组内各泳道平行性好,组间电泳行为差异不明显。存在明显的高丰度蛋白,蛋白总量满足接下来的质谱要求。

表 2 蚕卵蛋白浓度测定结果

Table 2 Protein content of *Bombyx mori* eggs incubated at high or low temperature

θ 催青 (℃) Incubation time	样品编号 Sample	ρ (蛋白) / ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) Protein content	V (样品) (μL) Sample volum	m (蛋白) (μg) Protein mass
15℃	T_15_1	7.97	1 500.0	11 962.2
	T_15_2	7.98	1 500.0	11 977.2
	T_15_3	7.98	1 500.0	11 970.5
25℃	T_25_1	7.52	1 400.0	10 532.7
	T_25_2	7.50	1 400.0	10 502.0
	T_25_3	7.51	1 400.0	10 520.0

2.3 质谱数据库筛选

质谱测序完成后,为了得到高质量的数据分析结果,首先做数据过滤。将谱图、肽段、蛋白 3 个层面鉴定的准确性 FDR 设定为 1%; 鉴定蛋白至少需要包含一个特异性 (Unique) 肽段。图 3-A 是经过数据过滤后鉴定的肽段和蛋白总数。从图中可以看出质谱检测产生的二级谱图数,即总谱图数 (Total spectra) 为 719 520 条,其中有效谱图数 (Matched spectra) 为 164 030 条,鉴定

肽段数 (Peptides) 为 28 334 条,根据匹配结果解析出的特异性肽段 (Unique peptides) 有 27 570 个。这些肽段对应的鉴定蛋白数 (Identified proteins) 有 3 817 个,可量化的蛋白 (Quantifiable proteins) 数有 3 076 个。图 3-B 是各组生物重复样本的相对标准差 (RSD),RSD 值越小,表明重复试验定量的波动程度越小。从图中看出 25℃ 催青蚕卵与 15℃ 催青蚕卵组间的 RSD 数据均小于 0.6,说明样本重复性较好,具有统计学一致性。

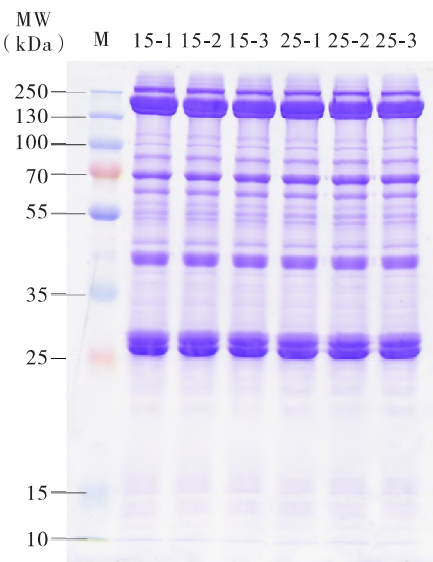


图2 高低温催青温度敏感期家蚕卵蛋白的 SDS-PAGE 电泳检测

Fig.2 SDS-PAGE electrophoresis detection of silkworm egg protein in temperature-sensitive period of high and low temperature

注: 泳道 M 为蛋白 Maker, 15-1、15-2、15-3 为 15℃ 催青组的三个重复样本, 25-1、25-2、25-3 为 25℃ 催青组的三个重复样本。Note: Lane M was the protein maker, 15-1, 15-2, and 15-3 were three replicates of the 15℃ group, and 25-1, 25-2, and 25-3 were three replicates of the 25℃ group.

2.4 差异蛋白质的分析

将 15℃ 催青组与 25℃ 催青组的质谱数据进行 分析, 首先通过样本定量值的 P -value 筛选差异表 达蛋白, 当 P -value < 0.05 时, 以差异表达量变 化超过 1.5 作为显著上调的变化阈值, 小于 1/1.5 作为显著下调的变化阈值。比较发现两个处理组 中差异表达的蛋白有 104 个, 其中 56 个蛋白上调, 48 个蛋白下调 (图 4)。表 3 是部分显著差异 蛋白。

2.5 差异蛋白的聚类分析

对 25℃ 和 15℃ 催青的蚕卵差异蛋白分别进行 了 GO 分类、KEGG 通路和蛋白结构域 3 个层面 的富集分析。图 5-A 是差异蛋白的本体聚类分析 (Gene Ontology, GO), 从图中可以看出差异蛋白 主要参与的生物过程有细胞过程 (Cellular process)、代谢过程 (Metabolic process)、生物调 节 (Biological regulation)、生长发育过程 (Developmental process)、多细胞生物过程 (Multicellular organismal process) 和胁迫应答 (Response to stimulus)。差异蛋白的分子功能主要 为催化活性 (Catalytic activity) 和结合 (Binding)。

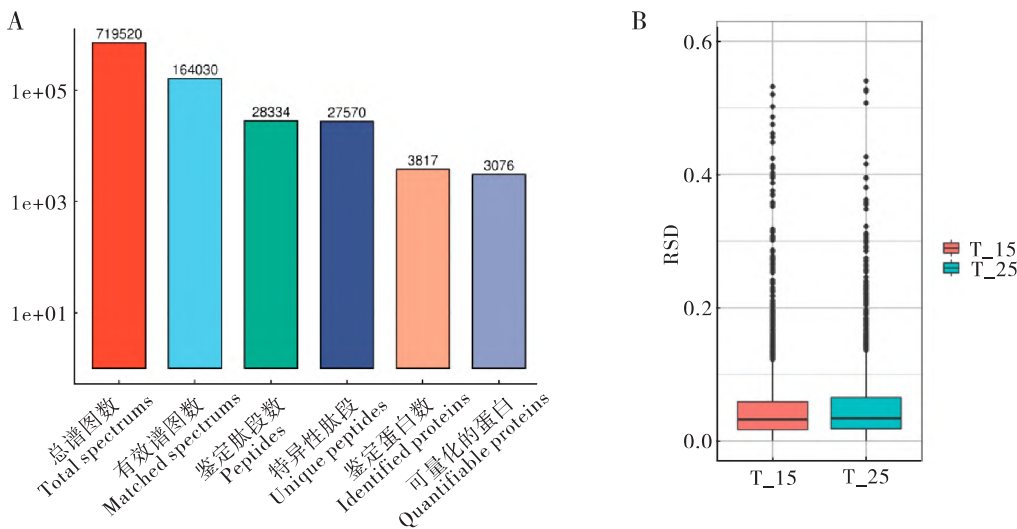


图3 差异蛋白质组学基础数据统计

Fig.3 Basic data statistics of differentially expressed proteomics

注: A, 蛋白质鉴定质谱结果统计图; B, 样品重复性的 RSD 检验。Note: A, Statistical chart of protein identification mass spectrometry results; B, RSD test of sample repeatability.

表 3 25℃/15℃下催青家蚕温度敏感期卵的差异表达蛋白

Table 3 Differentially expressed proteins of *Bombyx mori* temperature-sensitive eggs at 25℃/15℃

蛋白名称 Protein description	差异倍数 Ratio	上调/下调 Up/Down
L-乳酸脱氢酶 L-lactate dehydrogenase	1.556	Up
表皮蛋白 Cuticle protein	2.514	Up
丝氨酸蛋白酶抑制剂 8 Serpin-8	1.712	Up
短链脱氢酶/还原酶 Short-chain dehydrogenase/reductase	1.534	Up
微管蛋白 α -链 Tubulin α -chain	1.560	Up
尿苷二磷酸葡萄糖 4-表异构酶 UDP-glucose 4-epimerase	2.595	Up
含乌头酸酶结构域的蛋白质 Aconitase domain-containing protein	1.602	Up
乌头酸水合酶 Aconitate hydratase	1.688	Up
含核酸外切酶结构域的蛋白质 Exonuclease domain-containing protein	2.816	Up
甲基四氢叶酸环化水解酶 Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	1.630	Up
泛素硫酯酶 Ubiquitin thioesterase OTU1	1.662	Up
血管紧张素转化酶 Angiotensin-converting enzyme	1.624	Up
酒精脱氢酶 11 Alcohol dehydrogenase 11	1.620	Up
乙醇脱氢酶 Putative alcohol dehydrogenase	2.272	Up
磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 Phosphoenolpyruvate carboxykinase	1.552	Up
含有 Arf-GAP 结构域的蛋白质 Arf-GAP domain-containing protein	1.734	Up
甘露聚糖酶 Mannanase	2.143	Up
二氢嘧啶酶相关蛋白 2 Dihydropyrimidinase-related protein 2	1.710	Up
24-甾醇还原酶 24-sterol reductase	1.839	Up
短链脱氢酶 Short-chain dehydrogenase	1.508	Up
含有 LIM 结构域的蛋白质 LIM domain-containing protein	1.574	Up
DNA 指导的 RNA 聚合酶亚基 DNA-directed RNA polymerase subunit	1.695	Up
谷氧还蛋白 Glutaredoxin	1.606	Up
中等富含蛋氨酸的六聚体蛋白 Moderately methionine rich hexamerin	1.716	Up
苹果酸合酶 Malate synthase	2.717	Up
含有 LisH 结构域的蛋白质 LisH domain-containing protein	1.590	Up
β -N-乙酰氨基己糖苷酶 Beta-N-acetylhexosaminidase	1.519	Up
羧酸酯水解酶 Carboxylic ester hydrolase	2.733	Up
肽酶 S1 结构域蛋白 Peptidase S1 domain-containing protein	1.706	Up
尿酸酶 Uricase	3.231	Up
触角特异性蛋白 3c Antennal-specific protein 3c	1.601	Up
血淋巴保幼激素结合蛋白 Hemolymph juvenile hormone binding protein	1.864	Up
脱氧海丝氨酸合酶 Deoxyhypusine synthase	0.561	Down
跨膜蛋白 70 样线粒体 Transmembrane protein 70-like, mitochondrial	0.612	Down
转录起始因子 IIE 亚基 Transcription initiation factor IIE subunit alpha	0.603	Down
细胞色素 P450 Cytochrome P450	0.335	Down
葡萄糖醛酸转移酶 UDP-glucuronosyltransferase	0.664	Down
含有泛素样结构域的蛋白质 Ubiquitin-like domain-containing protein	0.634	Down
CP 型 G 结构域蛋白 CP-type G domain-containing protein	0.613	Down
ZZ 型结构域蛋白 ZZ-type domain-containing protein	0.618	Down

续表 3 Continued table 3

蛋白名称 Protein description	差异倍数 Ratio	上调/下调 Up/Down
碳酸酐酶 Carbonic anhydrase	0.356	Down
DNA 解旋酶 DNA helicase	0.659	Down
30K 蛋白 8 30K protein 8	0.580	Down
30K 蛋白 20 30K protein 20	0.372	Down
30K 蛋白 26 30K protein 26	0.458	Down
FHA 结构域蛋白 FHA domain-containing protein	0.648	Down
MMS1_N 结构域蛋白 MMS1_N domain-containing protein	0.653	Down
地芬甲酸酯合酶 Dipthine methyl ester synthase	0.526	Down
脱氧海丝氨酸羟化酶 Deoxyhypusine hydroxylase	0.635	Down
苹果酸酶 Malic enzyme	0.573	Down
肽基-脯氨酰顺反异构酶 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0.576	Down
含有酰胺酶结构域的蛋白质 Amidase domain-containing protein	0.535	Down
蛋白质转运蛋白 sec16 Protein transport protein sec16	0.646	Down
氨肽酶 Aminopeptidase	0.458	Down
丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 10 Serine/threonine-protein kinase 10	0.609	Down
金属蛋白酶 Putative metalloprotease	0.646	Down
含有 AMP 结合结构域的蛋白质 AMP-binding domain-containing protein	0.507	Down
RNA 解旋酶 RNA helicase	0.584	Down
P 型结构域蛋白 P-type domain-containing protein	0.603	Down
果糖二磷酸醛缩酶 Fructose-bisphosphate aldolase	0.310	Down
萤光素 4-单加氧酶 Luciferin 4-monooxygenase	0.546	Down
丝光蛋白 Sericotropin	0.432	Down

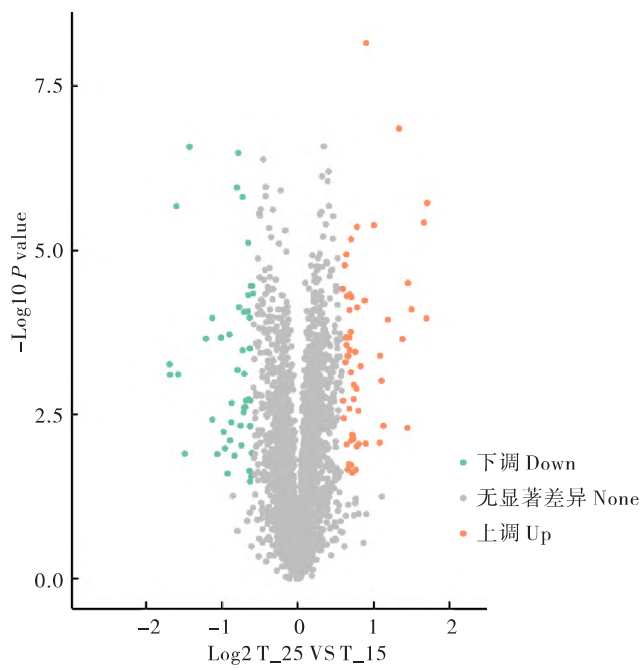


图4 25℃和15℃催青的蚕卵差异蛋白的火山图
Fig. 4 Volcano plots of differential protein expression
in silkworm eggs incubated at 25℃ and 15℃

图5-B是COG功能分类的结果,从图中可以看出差异蛋白的功能主要为翻译后修饰(Posttranslational modification)、蛋白质周转(Protein turnover)、分子伴侣(Chaperones)和物质代谢。对差异蛋白的亚细胞定位显示差异蛋白主要分布于细胞质、细胞质基质和细胞核中。

2.6 差异蛋白的KEGG功能富集分析

接下来对差异蛋白进行KEGG功能富集分析,通过气泡图的方式展现差异表达蛋白显著富集(P -value < 0.05)到的功能分类和通路。结果显示(图6),差异蛋白主要参与了乙醛酸和二羧酸代谢途径(Glyoxylate and dicarboxylate metabolism)、丙酮酸代谢途径(Pyruvate metabolism)和半乳糖代谢途径(Galactose metabolism)。其中,差异蛋白在乙醛酸和二羧酸代谢途径富集最为显著,所含5个显著差异蛋白全部上调。此外,在丙酮酸代谢途径中,苹果酸合酶显著上调,而苹果酸酶显著下调。这些差异蛋白的主要分子功能有:铁反应元件结合(Iron-

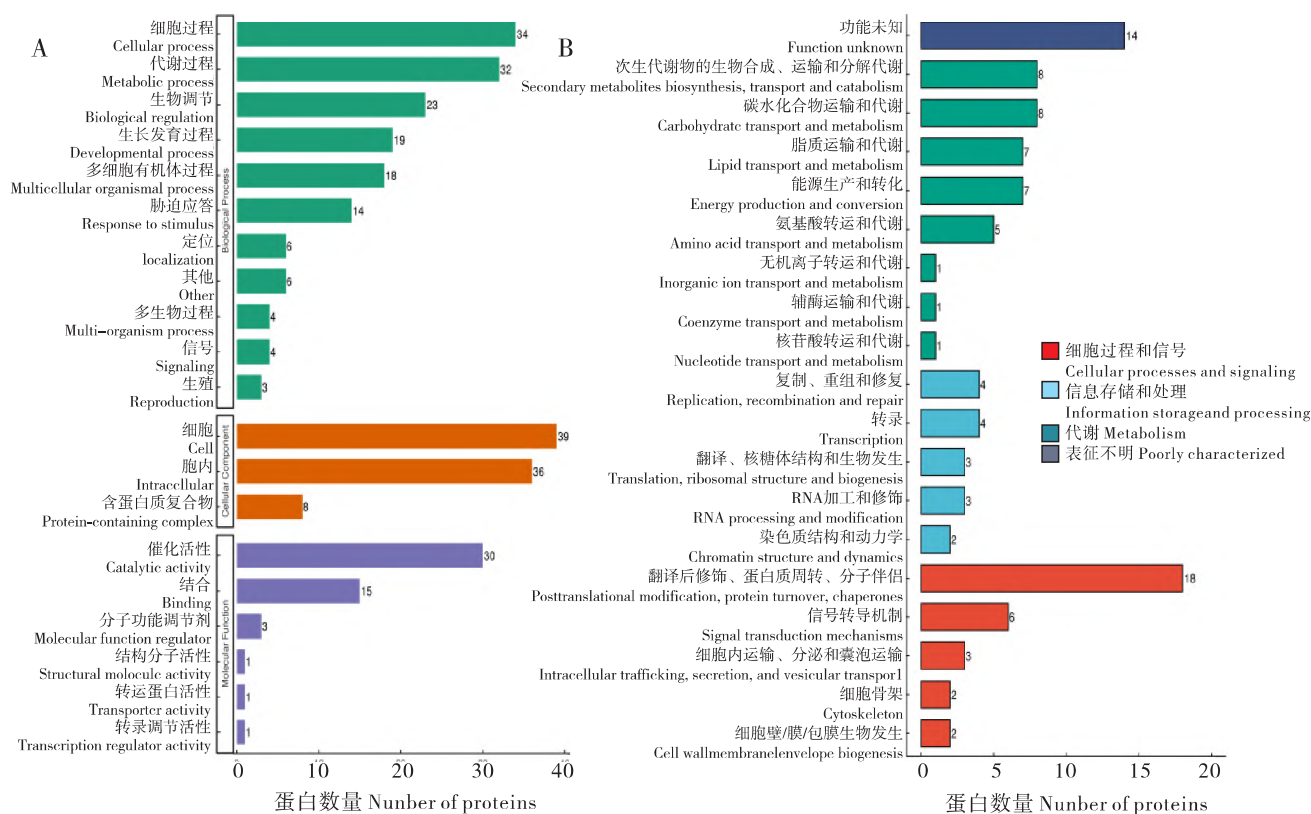


图5 差异蛋白的聚类分析

Fig. 5 Cluster analysis of differentially expressed proteins

注: A, 差异蛋白的 GO 分类; B, 差异蛋白的 COG 分类。Note: A, GO classification of differential protein expression; B, COG classification of differential protein expression.

responsive element binding)、催化活性 (Catalytic activity)、裂解酶活性 (Lyase activity)、乌头酸水合酶活性 (Aconitate hydratase activity)、水解酶活性 (Hydro-lyase activity)、外肽酶活性 (Exopeptidase activity)、葡萄糖醛酸转移酶活性 (Glucuronosyltransferase activity) 以及碳-碳裂解酶活性 (Carbon-carbon lyase activity)。

2.7 差异蛋白转录水平验证

为了验证上述差异蛋白定量结果,选取了参与代谢过程的 L-乳酸脱氢酶、地芬甲酸酯合酶、尿酸酶、脱氧海丝氨酸合酶、UDP-葡萄糖 4-差向异构体、泛素硫酯酶和氨肽酶; 参与胁迫应答的蛋白丝光蛋白、血管紧张素转化酶和触角特异性蛋白; 保幼激素信号通路中的保幼激素结合蛋白进行实时荧光定量 qRT-PCR 验证。图 7 分别是 qRT-PCR 检测结果, 15℃ 和 25℃ 催青组中, 目的蛋白转录水平的变化趋势与蛋白组学结果一致, 说明差异蛋白定量结果准确。

3 结论与讨论

家蚕滞育卵胚胎发育被划分为 30 个阶段, Xu 等 (1995) 以二化性家蚕品种大造为研究材料, 对蚕卵进行高低温 (25℃/15℃) 交替催青, 发现在第 20~23 阶段进行 25℃ 催青对诱导滞育至关重要, 22~25 期对滞育卵的诱导也很重要, 完整经历 20~25 阶段 25℃ 催青的蚕卵, 其子代滞育率升至 100%。这说明第 20~25 阶段是家蚕胚胎感受温度变化诱导子代进入滞育的敏感期。

本研究通过液相色谱-质谱串联技术对高、低温催青下家蚕敏感期卵的差异蛋白进行研究, 结果发现, 与 15℃ 催青的蚕卵相比, 25℃ 催青的蚕卵在敏感期蛋白表达显著上调的有 56 个, 显著下调的有 48 个, 这些蛋白可能参与了温度诱导家蚕子代滞育发生的调控过程。对差异表达蛋白的 GO 功能注释显示, 差异蛋白主要参与的生物过程有细胞过程、代谢过程、生物调节、生长发育过程、多细胞生物过程和胁迫应答。差异蛋白的分

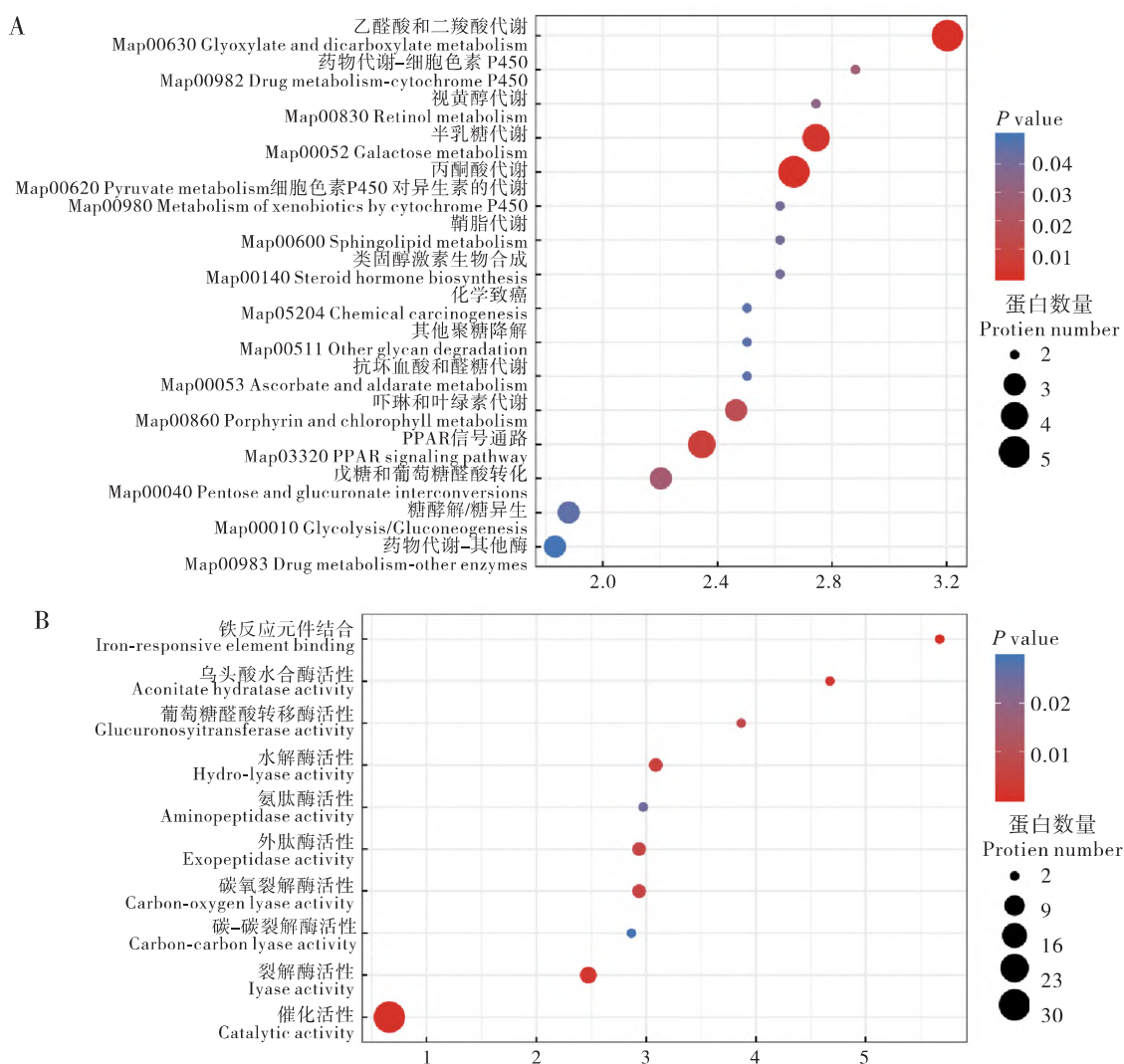


图6 差异蛋白的 KEGG 分析

Fig.6 KEGG analysis of differentially expressed proteins

注: A, 差异蛋白的 KEGG 通路分析; B, 差异蛋白的 KEGG 分子功能分析。纵轴为通路或功能分类, 横轴为差异表达蛋白在该功能类型中所占比例相比于鉴定蛋白所占比例的变化倍数 (Fold enrichment) 的 Log2 转换后的数值。圆圈颜色表示富集显著性 P -value, 圆圈大小表示功能类或通路中的差异蛋白个数。Note: A, KEGG pathway analysis of differential protein expression; B, KEGG molecular function analysis of differential protein expression. Vertical axis was the pathway or functional classification, and horizontal axis was the Log2-transformed value of the fold enrichment (Fold enrichment) of the proportion of differential protein expression in this functional type compared to the proportion of identified proteins. The color of the circle indicated the significant P -value of enrichment, and the size of the circle indicated the number of differential protein expression in the functional class or pathway.

子功能主要为催化活性和结合。KOG 功能分类的结果显示, 差异蛋白的功能主要为翻译后修饰、蛋白质周转、分子伴侣和物质代谢。KEGG 富集结果显示, 差异蛋白主要参与了乙醛酸和二羧酸代谢途径、丙酮酸代谢途径和半乳糖代谢途径。特定昆虫通过调节发育过程中的某一步骤, 在特定发育阶段进入滞育 (Miki *et al.*, 2020)。如, 烟草天蛾 *Manduca sexta* 蛹期滞育的原因被认

为是大脑分泌促前胸腺激素 (Prothoracicotrophic hormone, PTTH) 的释放量减少 (Tomioka *et al.*, 1995); 家蚕通过滞育激素诱导胚胎进入滞育 (Okitsugu, 1996); 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和库蚊 *Culex pipiens* 主要通过胰岛素 (insulin) 信号途径诱导成虫进入滞育 (Sim *et al.*, 2013)。保幼激素 (Juvenile hormone, JH) 被认为是调节昆虫变态、繁殖和滞育的重要激素

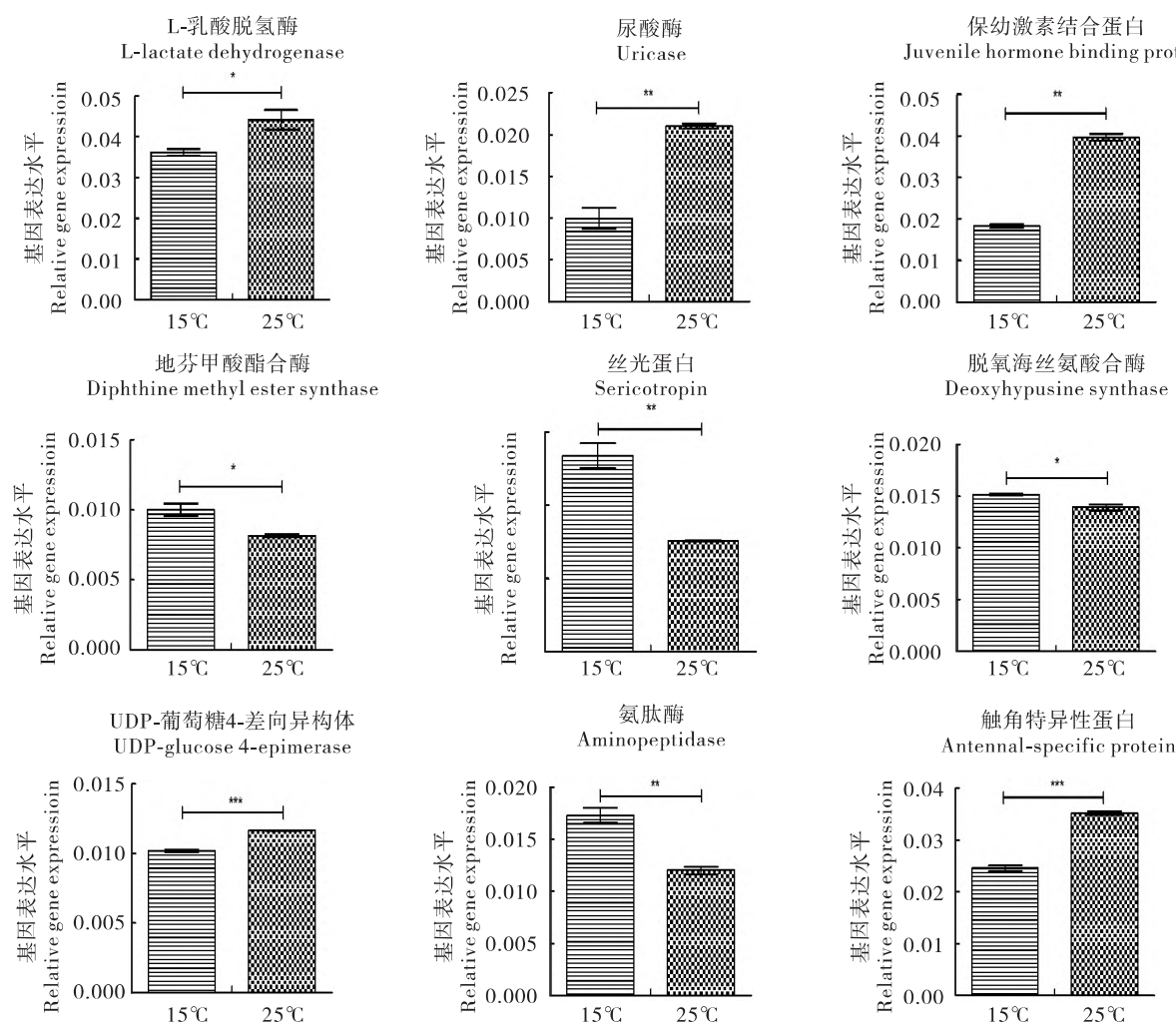


图7 25℃和15℃催青的蚕卵差异蛋白的转录水平定量结果

Fig. 7 Quantitative results of transcriptional levels of differential protein expression in silkworm eggs treated at 25°C and 15°C

注: qRT-PCR 检测差异基因表达情况。用内参基因 Eif-4A 使基因表达标准化。* 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$ 。Note: Differential gene expression was detected by qRT-PCR. Gene expression was normalized with the internal reference gene Eif-4A. * means $P < 0.05$, ** means $P < 0.01$, *** means $P < 0.001$.

之一 (Roy *et al.*, 2018)。胰岛素信号通过 JH 通路诱导滞育发生, 用外源性 JH 可以回补胰岛素受体敲除后引起的滞育改变 (Sim *et al.*, 2013)。大部分昆虫滞育的诱导和发生往往伴随着体内 JH 水平的显著降低, 但在少数昆虫中, 滞育也会随着体内 JH 增加而发生。短光照可诱导异色瓢虫 *Harmonia axyridis* 发生滞育, 其体内的 JH 滴度在短光照下饲养比在长光照下饲养更低 (Gao *et al.*, 2022)。Jiang 等 (2011) 的研究也表明, 在家蚕中提高保幼激素水平的同时, 降低蜕皮激素的水平可诱导滞育卵的产生。在筛选到的差异表达蛋白中发现, 保幼激素结合蛋白 (Juvenile hormone binding protein, JHBP) 在 25℃ 催青蚕卵中的表达

比 15℃ 催青蚕卵显著上调。在鳞翅目昆虫中, JH 信号主要由血淋巴中的物种特异性 JHBP 介导 (Li *et al.*, 2016)。在与其受体相互作用之前, JH 作为与 JHBP 的复合物被转运至靶组织, 在此期间, JHBP 是 JH 信号转运中的第一个关键元件 (Kramer *et al.*, 1974)。JHBP 将 JH 从血淋巴输送到靶器官的细胞, 并保护 JH 免受非特异性酯酶的降解 (Debski *et al.*, 2004)。来自不同物种的 JHBP 的序列分析表明, JHBP 蛋白与两个保守的 N 末端半胱氨酸残基具有高度相似性, 并且可以结合亲脂性小分子如 JH 的结构域 (Kolodziejczyk *et al.*, 2008)。保幼激素合成过程中 JHBP 基因的表达受 JH 负控制。JHBP 在高低温催青卵中的差

异表达, 也为研究家蚕滞育诱导的机制提供了新的靶标。

温度是影响家蚕卵滞育发生的最主要环境因素 (Bale *et al.*, 2010), 越来越多的研究表明温度应激反应与滞育之间关系密切。在家蚕的滞育过程中, 启动了一套应激反应机制来保证越冬存活, 如合成甘油和山梨醇 (Han, 1998; Kostal *et al.*, 2000)、热休克蛋白 (Hsps) 等分子伴侣的合成 (Rinehart *et al.*, 2007)。本研究发现的差异表达蛋白, 如 L-乳酸脱氢酶、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶、苹果酸酶和保幼激素结合蛋白等, 可能参与到这些物质的代谢和转化。

综上所述, 家蚕滞育诱导的分子机制较为复杂, 涉及多种信号通路和调控因子, 本研究利用蛋白组学技术初步发现多种信号通路和差异蛋白可能在家蚕受环境温度影响下诱导子代滞育的分子机制中起到重要作用, 为进一步研究滞育发生的分子机制研究提供候选蛋白。

参考文献 (References)

- Bale JS, Hayward SAL. Insect overwintering in a changing climate [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2010, 213 (6): 980–994.
- Chai H, Tian RL. Research progress of insect diapause [J]. *Inner Mongolia Science Technology & Economy*, 2019, 15: 97–100.
- [柴华, 田睿林. 昆虫滞育研究进展 [J]. 内蒙古科技与经济, 2019, 15: 97–100]
- Chen YR. Identification of Diapause-related Genes in *Bombyx mori* and Functional Study of *akr2e*-like Gene [D]. Zhenjiang: Jiangsu University of Science and Technology, 2019. [陈艳荣. 家蚕滞育关联基因的鉴定及 *akr2e*-like 基因的功能研究 [D]. 镇江: 江苏科技大学博士论文, 2019]
- Chino H. Carbohydrate metabolism in the diapause egg of the silkworm, *Bombyx mori*: Conversion of glycogen into sorbitol and glycerol during diapause [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1958, 2 (1): 1, IN1, 5–4, IN1, 12.
- Clapham DE. TRP channels as cellular sensors [J]. *Nature*, 2003, 426 (6966): 517–524.
- Debski J, Wyslouche - Cieszyńska A, Dadlez M, *et al.* Positions of disulfide bonds and N-glycosylation site in juvenile hormone binding protein [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, 421 (2): 260–266.
- Gao Q, Li B, Wei BX, *et al.* Juvenile hormone regulates photoperiod-mediated male reproductive diapause via the methoprene-tolerant gene in the ladybeetle *Harmonia axyridis* [J]. *Insect Science*, 2022, 29 (1): 139–150.
- Han EBE. Timing of diapause initiation, metabolic changes and overwintering survival of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* [J]. *Ecological Entomology*, 1998, 23 (2): 160–167.
- Hayakawa Y, Noguchi H. Growth-blocking peptide expressed in the insect nervous system-cloning and functional characterization [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 253 (3): 810–816.
- Homma T, Watanabe K, Tsurumaru S, *et al.* G protein-coupled receptor for diapause hormone, an inducer of *Bombyx* embryonic diapause [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, 344 (1): 386–393.
- Huang C. The transient receptor potential superfamily of ion channels [J]. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 2004, 15 (7): 1690.
- Jiang X, Huang S, Luo L. Juvenile hormone changes associated with diapause induction, maintenance, and termination in the beet webworm, *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2011, 77 (3): 134–144.
- Kolodziejczyk R, Bujacz G, Jakob M, *et al.* Insect juvenile hormone binding protein shows ancestral fold present in human lipid-binding proteins [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 377 (3): 870–881.
- Kostal VV, Simek P. Overwintering strategy in *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera): The relations between life-cycle, chill tolerance and physiological adjustments [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2000, 46 (9): 1321–1329.
- Kramer KJ, Sanburg LL, Kezdy FJ, *et al.* The juvenile hormone binding protein in the Hemolymph of *Manduca sexta* Johannsson (Lepidoptera: Sphingidae) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1974, 71 (2): 493–497.
- Kunio I, Takamichi K, Yoshitaka N, *et al.* Isolation and structure of diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 1991, 67 (6): 98–101.
- Lanfen F, Jianrong L, Yangsheng Z, *et al.* Shotgun proteomic analysis on the diapause and non-diapause eggs of domesticated silkworm, *Bombyx mori* [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8 (4): e60386.
- Li W, Cheng T, Hu W, *et al.* Genome-wide identification and analysis of JHBP-domain family members in the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2016, 291 (6): 2159–2171.
- Miki T, Shinohara T, Chafino S, *et al.* Photoperiod and temperature separately regulate nymphal development through JH and insulin/TOR signaling pathways in an insect [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117 (10): 201922747.
- Noguchi H, Hayakawa Y. Dopamine is a key factor for the induction of egg diapause of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268 (3): 774–780.
- Okitsugu Y. Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: Structure, gene expression and function [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1996, 42 (7): 669–679.
- Rinehart JP, Li A, Yocum GD, *et al.* Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104 (27): 11130–11137.

- Roy S , Saha TT , Zou Z , *et al.* Regulatory pathways controlling female insect reproduction [J]. *Annual Review of Entomology* , 2018 , 63: 489 – 511.
- Sato A , Sokabe T , Kashio M , *et al.* Embryonic thermosensitive TRPA1 determines transgenerational diapause phenotype of the silkworm , *Bombyx mori* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2014 , 111 (13) : E1249 – E1255.
- Sim C , Denlinger DL. Insulin signaling and the regulation of insect diapause [J]. *Frontiers in Physiology* , 2013 , 4: 189.
- Tomioka K , Agui N , Bollenbacher WE. Electrical properties of the cerebral prothoracicotropic hormone cells in diapausing and non – diapausing pupae of the tobacco hornworm , *Manduca sexta* [J]. *Zoology* , 1995 , 12 (2) : 165 – 173.
- Tsuchiya R , Kaneshima A , Kobayashi M , *et al.* Maternal GABAergic and GnRH/corazonin pathway modulates egg diapause phenotype of the silkworm , *Bombyx mori* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 2020 , 118 (1) : e2020028118.
- Xu WH. Research progress of insect diapause [J]. *Chinese Bulletin of Entomology* , 2008 , 4: 512 – 517. [徐卫华. 昆虫滞育研究进展 [J]. 2008 , 4: 512 – 517]
- Xu WH , Sato Y , Ikeda M , *et al.* Molecular characterization of the gene encoding the precursor protein of diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide (DH – PBAN) of the silkworm , *Bombyx mori* and its distribution in some insects [J]. *Bba Gene Structure & Expression* , 1995 , 1261 (1) : 83 – 89.
- Yasuhiro H , Toshio K , Yuji M. Sorbitol as an arrester of embryonic development in diapausing eggs of the silkworm , *Bombyx mori* [J]. *Journal of Insect Physiology* , 2000 , 46 (6) : 1009 – 1016.
- Zhang DW , Xiao ZJ , Zeng BP , *et al.* Insect behavior and physiological adaptation mechanisms under starvation stress [J]. *Frontiers in Physiology* , 2019 , 10: 163.