蛋白质组学方法在昆虫学研究中的应用*

黄志伟[1,2**]　黄勇平[2]　杜家纬[2]

(1. 上海职工医学院　上海　200237; 2. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所　上海　200032)

Application of proteomics in entomology research. HUANG Zhi-Wei[1,2**], HUANG Yong-Ping[2], DU Jia-Wei[2] (1. *Shanghai Medical Workers College*, Shanghai　200237, China; 2. *Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences*, Shanghai　200032, China)

Abstract　Proteomics research, as a new frontier developed recently in life science, has become one of the landmarks for the post genome era and widely spreadly implanted into every field of life science and medicine. The development of theory and technology in proteomics has proved new ideas and research fields for insect research. In this paper, the recent studies on the application of proteomics in insect research are reviewed.

Key words　insect, proteomics, progress

摘　要　蛋白质组学作为后基因组学时代研究的一个重要内容, 已广泛深入到生命科学和医药学的各个领域, 其理论和技术的发展完善也为昆虫学研究带来了新的思维方式和研究方向。文章就近年来蛋白质组学在昆虫研究中的应用加以综述。

关键词　昆虫, 蛋白质组学, 研究进展

蛋白质组学是近年来兴起的生命科学的前沿领域, 是生命科学进入后基因组(postgenome)时代的标志之一, 其理论和技术的发展完善也为昆虫学科的研究带来了新的思维方式和研究方向。其从整体的角度研究可以快速鉴定候选蛋白直至功能基因的能力是其它方法所不具备的, 一个非常具有说服力的例子: 有关昆虫神经肽的研究一直是昆虫学研究的热点方向之一, 在过去的几十年间, 应用传统的方法——烦琐、耗时而且需要相当多的样品, 在蝗虫 *locusta migratoria* 神经多肽研究方面仅有 40 余个神经多肽被分离、测序及功能研究[1], Baggerman 等应用蛋白质组技术从 1 只蝗虫神经组织的提取物中, 一次就成功地对 23 个多肽完成分离及序列分析工作, 其足以证实蛋白质组技术的快速与高效[2]。但相对于基因组研究的进展速度, 蛋白质组的研究显得相对滞后, 主要原因是研究手段中众多技术问题尚未很好解决。目前, 最现实、最有效的技术是双向凝胶电泳分离纯化蛋白质, 结合计算机定量分析电泳图谱, 进一步用质谱对分离到的蛋白质进行鉴定, 并运用现代生物信息学的知识和技术对所得到的数据进行处理, 对蛋白质以及它们执行的生命活动做出尽可能精细、准确、本质的阐述[3,4]。

目前人类、酵母的蛋白质组研究已全面展开, 昆虫的蛋白质组研究起步较晚, 但近几年研究得到了迅速发展。本文就蛋白质组学在昆虫学研究中的现状和应用作一介绍。

1　昆虫与其寄生虫的相互关系及协同进化研究

昆虫与其寄生虫之间经由 700 余万年的协同进化建立起来的这种复杂而‘协调’的关系, 使寄生虫不仅能侵入而且产生足量的孢子体为成功感染终宿主打下基础[5]。尽管前人已经积累了大量的昆虫与其寄生虫组织细胞之间的结构与功能关系的资料, 但它们之间的分子调节机制还远未阐明, 转录组学和蛋白质组学将为

*国家自然科学基金(No. 3050034)资助。

**E-mail: hzw423@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-12-19, 修回日期: 2006-01-10, 2006-02-27 再修回

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

全面研究它们之间的复杂关系提供新的技术和机遇[6~8]。

嗜血昆虫一直是卫生害虫防治的重点之一，嗜血昆虫的唾液不仅能够直接影响受叮咬脊椎动物凝血过程，引起炎症及免疫系统疾病，而且也为其它寄生虫的侵入提供了机会，对其唾液成分及与昆虫寄生虫的关系的研究一直是这方面的热点[9,10]。Rodriguez 等综述前人在这方面所取得的成果，总结传统的研究方法——步骤烦琐、低效，而且需要事先确定靶蛋白，这也是传统方法的一个缺点[8]。功能基因组及蛋白质组学的发展为这方面的研究带来了快速，高灵敏度，高分辨率，高通量的研究方法，加之昆虫基因组计划快速发展，为阐明象疟原虫与中间宿主及终宿主之间的复杂关系及其分子机理提供更为直接的证据[11,12]。

杨松等以斯氏按蚊 *Anopheles stephensi*——约氏疟原虫 *Plasmodiura yoelii* 为模型，用二维电泳（two-dimentional electrophoresis，2-DE）技术分析比较约氏疟原虫感染后雌性斯氏按蚊血淋巴蛋白差异，发现蛋白浓度和蛋白点的差异与硝喹诱导疟原虫卵囊黑化有关[13]。Levy 等对微生物感染果蝇 *Drosophila* 的系统免疫反应的多肽组及蛋白质组进行了分析，发现经细菌或真菌感染后，与对照相比有 90 多个蛋白发生上调或下调，其中有抗菌肽及一系列的与免疫反应相关的蛋白，同时也提供了一批新的与免疫反应相关的侯选蛋白[14]。类似的研究工作不断有文章发表[15,16]。

2 昆虫毒理及抗性研究

毒性基因组、蛋白质组及代谢组无疑将为一些毒素、杀虫剂等的作用机理提供更深层次的认识[17]。蛇和毒蝎分泌的毒液中含有多种对人和其它动物有毒的小肽，但相关的信息并不多，Diego-Garcia 等应用蛋白质组技术对巴西土蝎 *Tityus costatus* 的毒液组成进行分析，对从中分离得到的 19 种小肽进行质谱鉴定和 N 端测序，并分析其可能的功能[18]。*Bacillus thuringiensis*（Bt）蛋白被广泛用于农作物抗虫，虽然烟青虫 *Helicoverpa assulta* 中肠的刷缘囊泡常被用于研究 Bt 毒素的作用模式，但这种刷缘囊泡的蛋白组成人们还不了解，McNall 等报道了应用蛋白质组技术成功地鉴定几种新蛋白质，分别为 Bt Cry1Ac 结合蛋白（Bt Cry1Ac binding proteins）和 GPI 锚定蛋白（glycosylphosphatidyl inositol（GPI）anchored proteins），这些蛋白对研究 BT 蛋白的作用机理有重要的意义[19]。

赵瑞君等应用蛋白质组分析技术研究了家蝇 *Musca domestica* 的溴氰菊酯抗性品系与敏感品系蛋白表达的特征，发现抗性品系中至少有 3 个多肽点在敏感品系中未出现，很可能就是由抗药性基因诱导产生具抗性作用的蛋白质[20]。我们实验室应用蛋白质组技术研究了植物源杀虫剂印楝素的作用机理，发现经印楝素（azadirachtin）处理后蜕皮激素受体蛋白的表达明显的降低，推测印楝素能直接干预蜕皮激素受体蛋白的表达或/和通过降低昆虫体内的蜕皮激素滴度而间接影响蜕皮激素受体蛋白的合成，使昆虫正常的生理过程发生紊乱达到杀虫的目的[21]。Sharma 等应用同样的技术研究了杀虫剂氨基甲酸盐（BPMC）的作用机理，发现蛋白质的差异表达反映了杀虫剂处理引起昆虫细胞结构及代谢水平的变化[22]。

3 昆虫发育生物学研究

家蚕 *Bombyx mori* 胚胎发育时期蛋白质的一系列变化，反映了家蚕胚胎发育过程中基因表达的一个特点。钟伯雄采用蛋白质组分析技术，从蛋白质水平研究了家蚕胚胎发育时期的基因表达情况，发现不同胚胎发育时期之间的蛋白质图谱相互间存在差异，推断从临界期到点青期，结构基因表达变化不大；从点青期开始，结构基因表达变化显著[23]。家蚕催青期胚胎发育是蚕体内一系列生理生化反应的体现，是控制胚胎发育的基因有序表达的结果，颜新培等和钟伯雄等对家蚕催青期胚胎蛋白质组变化的规律进行了分析，为从分子水平阐明家蚕胚胎发育的机理提供了切入点[24,25]。家蚕脂肪体，是典型的变态模式组织，徐豫松等应用蛋白

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

质组等技术研究了家蚕5龄期和变态期脂肪体合成蛋白质的变化，研究了脂肪体基因表达的变化规律，为进一步揭示脂肪体的变态机理提供依据[26]。

蛋白质组研究的重要内容之一是建立细胞、组织或器官完整的蛋白质双向电泳图谱，颜新培等、沈飞英等分别对家蚕5龄期丝腺细胞的蛋白质组进行研究，构建了同一个体不同部位及雌雄个体之间的丝腺细胞蛋白质双向电泳图谱，为发现与丝腺细胞分泌丝素蛋白有关的功能蛋白质，揭示蚕茧高产的机理等进行了探索[27,28]。

4 抗虫转基因植物产品安全性研究

为提高农作物的产量和抗虫能力，生物技术被认为是改变作物性状使其更符合人类需求的有力工具，经选择的优势种基因、其它种植物的基因或非植物源的基因被转染或修饰后转染到目的作物，这些‘新蛋白质’的表达将导致植物呈现一个新的生理特征——表现高的抗虫或抗除草剂特性而达到改良的效果，但同时也引起人们对这些‘新蛋白质’是否会影响健康的广泛关注：(1)这些新基因及其表达产物本身可能固有的毒性，这些‘新蛋白质’可能具有导致基因突变或提高已有过敏原蛋白的表达水平；(2)引起一些潜在的(现在还未发现的)代谢途径的变化或引起植物某些固有的与营养不利的次生代谢毒物的过表达，最终使新产品的营养与传统食物发生显著的变化。这些具有高抗虫活性的转基因作物的产品对人的健康是否安全、营养价值与传统食品存在什么样的区别，转基因植物发生了什么样生理变化？蛋白质组为以上方面的研究提供了一个与传统方法完全不一样的方法，Malarkey 对近年来这方面的工作进行了综述[29]。

5 昆虫学研究中的方法探索及其它领域的应用

分离纯化在特定环境里表达的具有特定生物学功能的外源或内源基因编码的蛋白质，并进一步分析其功能是后基因组研究的一个重要领域[30]。蛋白质组研究为这一方面的研究提供了一个重要的手段，样品的制备是双向电泳的关键，家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis* 是感染家蚕的重要病原，对微孢子虫的研究一直是一个重要的课题。常规的提取家蚕微孢子虫总蛋白由于其抽提缓冲液中含有离子去污剂及盐份等组分对双向电泳结果影响较大，且不宜做进一步分析。刘加彬等对适用于双向电泳的家蚕微孢子虫总蛋白的提取方法进行了摸索，采用液氮多次冻融结合手工研磨，再用裂解液抽提的方法能够得到产率较高且适用于双向电泳的家蚕微孢子虫总蛋白，可进一步用于质谱分析[31]。钟伯雄等以家蚕为材料研究了多种蛋白质抽提缓冲液、溶解缓冲液对提取样品的影响，初步确定了适合家蚕蛋白质样品提取的抽提缓冲液和溶解缓冲液[32]。

随着模式动物——果蝇基因组测序工作的完成[33]，为了从如此巨大的数据中得到更为有生物学意义的信息，构建果蝇的蛋白质组图谱受到人们的广泛关注。Ericsson 等在研究果蝇头、胸、腹的 2-DE 图谱中共有 1 200 个蛋白质被检测出，大多数在这 3 个组织中相同，少部分有组织特异性[34]；Vierstraete 等首次报道了构建的果蝇血淋巴 2-DE 图谱并利用质谱技术鉴定了其中的 32 个蛋白点，分别为储存蛋白、转运蛋白、结构蛋白、酶等[35]；Sofia 等在以上研究成果的基础上对果蝇3龄幼虫血淋巴进行蛋白质组分析，300 个左右的蛋白被分离，其中 99 个蛋白被鉴定，大大地丰富了昆虫蛋白质数据库[36]。家蚕基因组研究进展较快，但有关家蚕基因功能的研究开展不多，钟伯雄以5龄家蚕体壁、中肠和脂肪为材料抽提蛋白质样本，采用双向电泳、蛋白质氨基酸序列分析及同源性检索等实验方法，对其中的40个蛋白质斑点进行了氨基酸序列分析及同源性检索，发现其中58.5%的蛋白质与果蝇的有关蛋白质具有较高同源性，36.5%与其他生物的蛋白质具有较高同源性[37]。Verleyen 等和 Jung 等应用蛋白质组技术分别研究了绿蝇 *Lucilia illustri* 神经肽

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

(SIFamide)和蚕蛾芳基脂蛋白(arylphorin)结构与其功能的相互关系[38,39]。李凯等对常见尸食性蝇类初孵幼虫蛋白质组双向凝胶电泳和图像分析,研究了蛋白质组作图对鉴别形态学极易混淆的昆虫种类是可行的[40]。

6 前景和展望

蛋白质组学提供了一系列能够在蛋白质水平上大规模地直接研究基因功能的强有力的工具。特别是利用多种质谱法对凝胶电泳分离的蛋白质进行研究,是通过生化途径研究蛋白质功能的重大突破。但蛋白质组学作为一门新兴的学科,才刚刚起步,目前仍然存在着一些技术上的挑战和缺陷,例如,细胞内的低拷贝数蛋白质分辨率问题;疏水性膜蛋白的分离及鉴定的问题;蛋白质组的纯化及定量问题等。对蛋白质组的研究将继续在大规模、灵敏度和完整性等方面进行改进。

随着蛋白质组学研究的深入,它将对昆虫学、医学、微生物学等的研究起到积极的促进作用。目前虽然有关昆虫蛋白质组研究的论文相对于免疫学、肿瘤学、微生物学、植物学较少,但我们相信,随着昆虫蛋白质组研究的不断深入,特别是模式昆虫功能基因组、蛋白质组研究的进展,在阐明诸如生长、发育、进化、代谢调控等生命活动的规律及农药抗性等方面会有重大突破。对昆虫蛋白质组的研究也正向以下几个方向发展。

6.1 蛋白质—蛋白质相互作用研究

大多数蛋白质都会与其它蛋白质有瞬时的或稳定的相互作用,而研究这些相互作用将会更深入地理解基因的功能。昆虫蛋白质组学研究将提供大量的蛋白质间相互作用的数据,这将为阐明昆虫的生长发育及与其寄生虫协同进化等提供重要的理论根据。因此,构建蛋白质间相互作用的数据库对于昆虫蛋白质组学,甚至生物学界来说都是非常有用的工具。

6.2 亚蛋白质组研究

目前蛋白质组技术还没有办法完全确定基因组表达的所有蛋白质,而且如果把蛋白质组分解为几个亚蛋白质组(sub-proteome)将有利于提高蛋白质的动态分辨率。现在已经有一些昆虫亚蛋白质组数据库可以得到,这些亚蛋白质组2-DE参考图谱对随后的蛋白质差异表达和翻译后修饰有很大帮助。

6.3 昆虫毒理机理研究

蛋白质组学有助于研究一种新的杀虫药物是否确实影响了选择的蛋白靶点,成为揭示杀虫剂的机理及新药开发的有力工具;蛋白质组学在昆虫药物研究中的另一个重要应用是调查药物耐药性的动态变化。

参 考 文 献

1 Schoofs L., Veelaert D., Vanden Broeck J., De Loof A. *Peptides*, 1997, **18**(1): 145~56.

2 Baggerman G., Clynen E., Huybrechts J., Verleyen P., Clerens S., *et al*. *Peptides*, 2003, **24**(10): 1 475~1 485.

3 Humphery-Smith I., Cordwell S. J., Blackstock W. P. *Electrophoresis*, 1997, **18**(3): 1 217~1 242

4 范冬梅,杨铭. 中国生化药物杂志, 2005, **26**(3): 182~184

5 Joy D., Feng X., Mu J., Furuya T., Chotivanich K., *et. al*. *Science*, 2003, **300**(5 617): 318~321.

6 Terry W. P. *Trends in Microbiol*., 2001, **9**(7): 299~301.

7 Ribeiro J. M., Francischetti I. M. B. *Annu. Rev. Entomol*., 2003, **48**: 73~88.

8 Rodriguez M. H., Hernandez-Hernandez F. C. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 2004, **34**(7): 615~624.

9 Jones L. D., Hodgson E., Williams T., Higgs S., Nuttall P. A. *Mal. Vet. Entomol*., 1992, **6**(3): 261~265.

10 Belkaid Y., Kamhawi S., Modi G., Valenzuela J., Noben-Trauth N., *et. al*. *J. Exp. Med*., 1998, **188**(10): 1 941~1 953.

11 Jesus G. V. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 2002, **32**(10): 1 199~1 209.

12 Valenzuela J. G. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 2002, **32**(10): 1 199~1 209.

13 杨松,黄复生,吴玉章,况明书,牟芝蓉,等. 第三军医大学学报, 2004, **26**(1): 29~31.

14 Levy F., Rabel D., Charlet M., Bulet P., Hoffmann J. A., *et al*. *Biochimie*, 2004, **86**(9~10): 607~616.

15 Vierstraete E., Verleyen P., Sas F., Van den Bergh G., De Loof A., *et al*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2004, **317**(14): 1 052~1 060.

16 Loseva O., Engstrom Y. *Mol. Cell. Proteomics*., 2004, **3**(8): 796~808.

17 Smith L. L. *Trends Pharmacol. Sci*., 2001, **22**(6): 281~

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

285.
18 Diego-Garcia E., Batista C. V. F., Garcia-Gomez B. I., Lucas S., Candido D. M., *et al*., *Toxicon*., 2005, **45**(3): 273~283.
19 McNall R. J., Adang M. J. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 2003, **33**(10): 999~1 010.
20 赵瑞君, 李国锦, 尹镭, 殷国荣, 乔中东. 山西农业科学, 1996, **24**(2): 54~57.
21 Huang Z., Shi P., Dai J., Du J. *Pestic. Biochem. Physiol*., 2004, **80**(2): 85~93.
22 Sharma R., Komatsu S. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 2004, **34**(5): 425~432.
23 钟伯雄, 遗传学报, 1999, **26**(4): 627~633.
24 颜新培, 钟伯雄, 徐孟奎, 梁建设, 沈飞英. 昆虫学报, 2005, **48**(2): 295~300.
25 钟伯雄, 陈金娥, 颜新培, 徐孟奎, 梁建设. 昆虫学报, 2005, **48**(4): 637~642.
26 徐豫松, 徐俊良, 川崎秀树. 蚕业科学, 2000, **26**(4): 239~243.
27 颜新培, 钟伯雄, 徐孟奎, 郭定国, 姚国华. 蚕业科学, 2003, **29**(4): 344~348.
28 沈飞英, 钟伯雄, 楼程富, 苏松坤, 徐海圣, 等. 蚕业科学, 2006, **32**(1): 1 052~1 058.
29 Malarkey T. *Mut. Research*, 2003, **544**(2~3): 217~221.
30 Tetaud E., Lecuix I., Sheldrake T., Baltz T., Fairlamb A. H. *Mol. Biochem. Parasitol*. 2002, **120**(2): 195~204.
31 刘加彬, 潘国庆, 周泽扬, 夏庆友. 蚕学通讯, 2002, **22**(2): 8~11.
32 钟伯雄, 颜海燕, 沈飞英, 李建科, 周丽. 蚕业科学, 2003, **29**(4): 427~432.
33 Adams M. D., Celniker S. E., Holt R. A., Evans C. A., Gocayne J. D., *et al*., *Science*, 2000, **287**(5 461): 2 185~2 195.
34 Ericsson C., Petho Z., Mehlin H. *Electrophoresis*, 1997, **18**(3~4): 484~490.
35 Vierstraete E., Cerstiaens A., Baggerman G., Van den Bergh G., De Loof A., *et al*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 2003, **304**(4): 831~838.
36 Sofia M. G., Rui V., Kenneth T., Rosário M. D., Ferrer C., *et al*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 2003, **312**(3): 545~554.
37 钟伯雄. 遗传学报, 2001, **28**(3): 217~224.
38 Verleyen P., Huybrechts J., Baggerman G., Lommel A. V., Loof A. D., *et al*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 2004, **320**(2): 334~341.
39 Jung H., Kim Y. H., Kim S. *Biochem. Biophys. Res Commun*., 2005, **331**(1): 100~106.
40 李凯, 叶恭银, 胡萃. 昆虫学报, 2005, **48**(4): 576~581.

橘小实蝇复合体分类学研究进展*

陈 鹏[1,2]** 叶 辉[1]***

(1. 云南大学生命科学学院生物系 昆明 650091; 2. 云南省林业科学院 昆明 650204)

Advances in taxonomy of *Bactrocera dorsalis* complex. CHEN Peng[1,2]**, YE Hui[1]***(1. *Department of Biology, Yunnan University, College of Life Sciences*, Kunming 650091, China; 2. *Yunnan Academy of Forestry*, Kunming 650204, China)

Abstract The *Bactrocera dorsalis* complex of tropical fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae), a group of insect pests of fruits and crops, contains 75 described species, largely endemic to regions of Asia, Australia and the Pacific. The taxonomic studies of *B. dorsalis* complex by morphological and genetic characters are reviewed. It is helpful to apply the molecular approach to taxonomic and phylogenetic analysis for the complex. And the outlook of phylogenetics and behavioral study of the complex will be focused in the future.

Key words *Bactrocera dorsalis*, complex, taxonomy

* "973"国家重点基础研究发展计划(2003CB415100)及国家自然科学基金资助项目(30260023)。

** E-mail: chenpengkunming@yahoo.com.cn.

***通讯作者, E-mail: yehui@ynu.edu.cn

收稿日期: 2005-12-28, 修回日期: 2006-02-27

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n