

# 溴氰菊酯胁迫下小菜蛾泛素化蛋白的分析与鉴定

杜亚琼<sup>1</sup>, 张 宏<sup>1</sup>, 李凤良<sup>2</sup>, 程罗根<sup>1</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)  
(2. 贵州省农业科学院植保所, 贵州 贵阳 550006)

[摘要] 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳、Western Blot 和 LC MS/MS 技术, 对在溴氰菊酯胁迫下的小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 四龄幼虫的泛素化蛋白 (Ubiquitinated protein) 的组分进行分析, 结果表明小菜蛾溴氰菊酯敏感品系与小菜蛾溴氰菊酯抗性品系里的泛素化蛋白表达量有显著差异. 本实验成功证明了在药剂胁迫下小菜蛾泛素化蛋白存在表达上的差异, 该研究结果为分析昆虫细胞中泛素的功能及其对昆虫生理、生化和环境胁迫等方面的调节作用提供了参考.

[关键词] 小菜蛾, 溴氰菊酯, 泛素化蛋白, 差异

[中图分类号] S481+4 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2013)02-0108-05

## Changes of the Ubiquitinated Proteins Stressed Under the Deltamethrin in Diamondback Moth, *Plutella Xylostella* L.

Du Yaqiong<sup>1</sup>, Zhang Hong<sup>1</sup>, Li Fengliang<sup>2</sup>, Cheng Luogen<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)  
(2. Institute of Plant Protection, Guizhou Academy of Agriculture Science, Guiyang 550006, China)

**Abstract:** The aim of this study was to analyse the Ubiquitinated protein in the 4rd larvae of *Plutella xylostella* under the stress of deltamethrin using SDS-PAGE, Western Blot and LC MS/MS. The results revealed significant differences in Ubiquitinated protein expression between deltamethrin-resistant strain and deltamethrin-sensitive strain of *Plutella xylostella*. It is successfully proved the differences in Ubiquitinated protein expression of *Plutella xylostella* under the stress of deltamethrin. The study provides a reference for analysing the function of Ubiquitin in the insect cells and the regulation function of it in physiology, biochemistry and environmental stress.

**Key words:** *Plutella xylostella*, Ubiquitin gene family, RNAi, gene silencing

泛素 (Ubiquitin) 是一种广泛存在于真核细胞中的小分子蛋白质, 其基本功能是通过泛素-蛋白水解酶复合体通路 (Ubiquitin Proteasome Pathway, UPP) 高效并高度选择性降解蛋白质<sup>[1,2]</sup>. 目前已发现泛素参与细胞中大多数短周期寿命蛋白的级联反应, 它参与细胞内的多种代谢反应, 如 DNA 损伤修复、炎症调节、信号传递等几乎一切生命活动的调节<sup>[3]</sup>. 因此, 在昆虫分子机制的研究中, 泛素化蛋白的生理功能成为近些年的热点. 小菜蛾 (*Plutella xylostella* L.) 是十字花科蔬菜的主要害虫, 对生产中应用的绝大部分药剂产生了抗药性<sup>[4]</sup>, 因此探索泛素化蛋白质组在小菜蛾生理机制中的作用对农业害虫的防治有重要意义.

由于小菜蛾是非模式生物, 因此选择一个合适的蛋白组学方法研究它的泛素化蛋白质组至关重要<sup>[5]</sup>. 本实验拟从聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、Western Blot、LC MS/MS 等方面对小菜蛾溴氰菊酯敏感品系 (M) 和小菜蛾溴氰菊酯抗性品系 (K) 进行比较分析, 从蛋白水平上分析小菜蛾泛素化蛋白的表达差异, 旨在进一步探究昆虫在药剂胁迫下蛋白质的表达、功能, 并分析其相互作用的特点.

收稿日期: 2013-01-23.  
基金项目: 国家自然科学基金 (31071974).  
通讯联系人: 程罗根, 博士, 教授, 研究方向: 分子遗传学, 遗传毒理学. E-mail: chenglugen@njnu.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验采用的材料为贵州省农业科学院提供的小菜蛾幼虫. 供试小菜蛾采自贵州省贵阳市花溪区中曹乡的甘蓝地,经室内饲养1代后测得四龄幼虫的LD<sub>50</sub>值,与武汉市蔬菜研究所提供的小菜蛾敏感种群四龄幼虫的LD<sub>50</sub>值比较,证明供试小菜蛾田间种群为敏感种群<sup>[6]</sup>.

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 小菜蛾蛋白样品的制备

随机取抗敏品系小菜蛾四龄幼虫各10只,放入预冷的研钵,用液氮充分研磨,向其中加入预冷至4℃的细胞裂解液(50 mM HEPES(pH 7.5),5 mM EDTA,150 mM NaCl和1% Triton X-100),并按比例加入蛋白酶抑制剂PMSF和10 mM N-ethylmaleimide,超声破碎,15,000g离心30 min,取上清,得到小菜蛾总蛋白,-70℃密封保存备用.

#### 1.2.2 泛素化蛋白样品的提取

泛素化蛋白提取采用美国MERCK公司的泛素化富集试剂盒Cat. No. 662200方法. 将小菜蛾总蛋白稀释到1 mg/mL,取0.5 mg~1.0 mg的总蛋白,按比例加入蛋白酶抑制剂PMSF和10 mM N-ethylmaleimide,20 000 g离心30 min,取上清,重复3次. 试剂混匀后取40 μL磁珠加入到已处理好的样品中. 将磁珠和样品混匀,用封口膜封住管口,置于1% Triton X-100裂解液中充分洗涤,离心(4℃,1 000 g,5 s),除去上清,重复3次以上,以获得泛素化蛋白. 利用上海捷瑞公司Bradford法蛋白定量试剂盒(GK5021)测蛋白浓度.

#### 1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析

将富集好的泛素化蛋白与2×上样缓冲液混匀,沸水浴10 min,使之充分溶解. 采用上海天能公司的EPS-300对蛋白进行SDS-PAGE电泳,分离胶为12%,浓缩胶为4%. 电泳完毕后将胶剥离,用0.1%考马斯亮蓝R250进行染色1h,然后用乙酸甲醇脱色法进行脱色2~3次,每次1 h,清水中过夜.

#### 1.2.4 Western-blotting分析

将小菜蛾泛素化蛋白进行SDS-PAGE电泳,然后电转印到PVDF膜上. 转膜后,经Western blot封闭液室温振荡,取下硝酸纤维素膜,TBS短暂漂洗后经5%光明脱脂奶粉室温封闭1 h,TBST漂洗3次后,与Anti-Ubiquitin(Cat. no. 662099)多抗孵育过夜,次日TBST漂洗3次,与抗兔IgG孵育1 h,最后TBST洗膜3次,Odyssey红外激光成像系统扫描实验结果.

#### 1.2.5 LC MS/MS

将小菜蛾敏感品系(M)和抗性品系(K)泛素化蛋白在SDS-PAGE胶上的条带切下,根据其分子量和浓度将样品分成3份,送到深圳华大基因公司进行LC MS检测,鉴定出其中的蛋白组分.

#### 1.2.6 质谱分析

由于小菜蛾是非模式生物,本次选用数据库为家蚕数据库silkwirm\_glean\_pep. fa蛋白库(共14623条序列). 该数据库下载地址:<http://www.silkgdb.org/silkgdb/doc/download.html>.

## 2 结果与分析

### 2.1 小菜蛾泛素化蛋白电泳结果比较

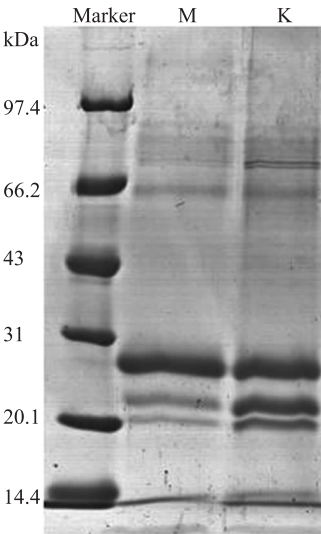
对小菜蛾溴氰菊酯敏感品系(M)和小菜蛾溴氰菊酯抗性品系(K)幼虫的聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳图见图1. 分析结果表明,两种不同小菜蛾品系表达的蛋白质种类和组成存在一定的差异,推测在溴氰菊酯胁迫下,小菜蛾体内的泛素化蛋白发生了选择性表达.

### 2.2 小菜蛾泛素化蛋白免疫印迹分析

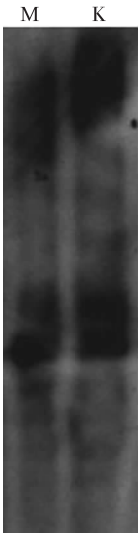
严格控制实验条件,对小菜蛾两种品系泛素化蛋白进行Western blotting检测,结果见图2. 结果显示,在小菜蛾两种品系都检测到了被富集的小菜蛾泛素化蛋白,但泛素化蛋白在谱带方面没有显著差异.

2.3 利用 LC MS/MS 对泛素化蛋白鉴定结果统计

蛋白质泛素化作用是后翻译修饰的一种常见形式,该过程能够调节不同细胞途径中各式各样的蛋白质底物. 通过对小菜蛾蛋白两个品系蛋白的分析,鉴定到的小菜蛾溴氰菊酯敏感品系(M)和小菜蛾溴氰菊酯抗性品系(S)的蛋白数目结果如表 1 所示. 其中可识别的泛素化蛋白个数:敏感品系 23 个,抗性品系 10 个.



Marker-标准蛋白, M-小菜蛾溴氰菊酯敏感品系泛素化蛋白, K-小菜蛾溴氰菊酯抗性品系泛素化蛋白.



M-小菜蛾溴氰菊酯敏感品系泛素化蛋白, K-小菜蛾溴氰菊酯抗性品系泛素化蛋白.

图 1 小菜蛾泛素化蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱比较

Fig.1 SDS-PAGE results of Ubiquitinated protein from different *Plutella xylostella* larva

图 2 小菜蛾泛素化蛋白 Western blot 验证

Fig.2 Western blot results of Ubiquitinated proteins from *Plutella xylostella*

表 1 泛素化蛋白鉴定结果统计

Table.1 Numbers of the peptides identified from the 4rd instar of *Plutella xylostella*

Sample ID	Identified Ubiqu-proteins	Identified Ubiqu-peptides	Identified Ubiqu-spectra	Ubiqu-sites
M	23	21	52	22
K	10	9	31	10

注释:“Identified Ubiqu-proteins”为识别的可信的泛素化蛋白质个数;“Identified Ubiqu-peptides”为识别的可信的泛素化肽段个数;“Identified Ubiqu-spectra”为对对应到可信泛素化肽段的图谱张数;“Ubiqu-sites”为识别的赖氨酸泛素化位点个数.

2.4 小菜蛾溴氰菊酯抗性品系(K)和溴氰菊酯敏感品系(M)泛素化蛋白结果

鉴定到的小菜蛾溴氰菊酯抗性品系泛素化蛋白结果如表 2 所示. 其中从这 2 个品系里都被鉴定出来的蛋白质有 polyubiquitin、ubiquitin/ribosomal protein L40 fusion protein, 这些蛋白可以直接定位细胞内将要降解的蛋白. 从抗性品系(DR)里鉴定到的 Carbonic AnHydrase family member(cah-5), Dihydrolipoamide dehydrogenase, ubiquitin and ribosomal protein S27a 等蛋白分子量普遍不高, 这些小分子蛋白在昆虫体内对机制调节等起着重要作用, 可能与昆虫的耐药性相关. 从敏感品系(DS)里鉴定到的蛋白甲基转移酶 DNA cytosine-5 methyltransferase 在黑腹果蝇里有相关报道. 此外还有一些蛋白目前国内外并没有报道, 这需要我们进一步去研究它们的功能与作用.

3 讨论

昆虫对杀虫剂的抗药性是在药剂的长期选择作用下,昆虫产生的一种生态适应和进化现象<sup>[7,8]</sup>. 这种复杂的选择过程显然与多种代谢和调节相关,需要多种蛋白质和酶的参与. 张娜娜<sup>[9]</sup>等对小菜蛾抗溴氰菊酯品系和敏感品系成虫细胞的蛋白质组进行了双向电泳和质谱分析,找到了 8 个表达量差别在 2.5 倍以上的蛋白质点,经过数据库信息检索最终鉴定出 7 个蛋白. 目前国内外仅报道了家蚕(*Bombyx mori*)<sup>[10]</sup>、德国小蠊(*Blattella germanica*)<sup>[11]</sup>、小菜蛾(*Plutella xylostella*)<sup>[12]</sup>等几种昆虫的泛素基因序列,但是对昆虫细胞中泛素的功能以及昆虫生理、生化和环境胁迫等方面的调节作用等报道相对较少.

表 2 泛素化蛋白的串联质谱(LC MS/MS)的鉴定结果  
Table2 The result of LC/MS/MS identification about Ubiquitinated proteins

No	Protein name and species	Protein Score	Protein mass	Accession Number
Identified from DM				
1	PREDICTED; similar to phospholipase A2, group VI isoform a, <i>Tribolium castaneum</i>	664	64 610	BGIBMGA011625-PA
2	CG1234-PA, <i>Drosophila melanogaster</i>	664	98 348	BGIBMGA008716-PA
3	PREDICTED; similar to Gef26 CG9491-PA, <i>Apis mellifera</i>	664	64 610	BGIBMGA004936-PA
4	PREDICTED; similar to CG15151-PA, <i>Tribolium castaneum</i>	27	98 348	BGIBMGA000684-PA
5	PREDICTED; similar to CG3605-PA, <i>Tribolium castaneum</i>	29	98 348	BGIBMGA004823-PA
6	Carbonic AnHydrase family member( cah-5 ), <i>Caenorhabditis elegans</i>	29	23 285	BGIBMGA013578-PA
7	Dihydroliipoamidedehydrogenase, <i>Bombyx mori</i>	30	52 911	BGIBMGA000292-PA
8	ubiquitin and ribosomal protein S27a, <i>Bombyx mori</i>	664	22 870	BGIBMGA011273-PA
9	PREDICTED; similar to Spectrin alpha chain, brain ( Spectrin, non-erythroid alpha chain ) ( Alpha- II spectrin ) ( Fodrin alpha chain ) isoform 16, <i>Mus musculus</i>	30	28 095	BGIBMGA007948-PA
10	conserved hypothetical protein, <i>Aedes aegypti</i>	30	24 727	BGIBMGA005074-PA
11	PREDICTED; similar to ADP ribosylation factor 102F CG11027-PA, <i>Apis mellifera</i>	28	18 544	BGIBMGA008894-PA
12	candidate olfactory receptor, <i>Bombyx mori</i>	29	22 846	BGIBMGA001505-PA
13	ubiquitin/ribosomal protein L40 fusion protein, <i>Bombyx mori</i>	411	15 072	BGIBMGA010604-PA
14	GA15482-PA, <i>Drosophila pseudoobscura</i>	34	16 980	BGIBMGA009969-PA
15	polyubiquitin, <i>Bombyx mori</i>	634	17 206	BGIBMGA001549-PA
16	tyrosine hydroxylase, <i>Papilio xuthus</i>	39	63 658	BGIBMGA000563-PA
17	PREDICTED; similar to CG1662-PA, <i>Apis mellifera</i>	34	24 578	BGIBMGA011829-PA
18	PREDICTED; similar to Protein kinase 61C CG1210-PC, isoform C, <i>Apis mellifera</i>	29	60 789	BGIBMGA011755-PA
19	CG5706-PA, <i>Drosophila melanogaster</i>	42	66 067	BGIBMGA006424-PA
20	Uncharacterized protein	35	17 929	BGIBMGA000978-PA
21	Uncharacterized protein	33	116 824	BGIBMGA008993-PA
22	19.8 kDa small heat shock protein, <i>Choristoneura fumiferana</i>	24	21 664	BGIBMGA004630-PA
23	PREDICTED; similar to CG31163-PB, isoform B, <i>Tribolium castaneum</i>	31	71 765	BGIBMGA008105-PA
Identified from DS				
24	DNA cytosine-5 methyltransferase, <i>Bombyx mori</i>	23	286 441	BGIBMGA011857-PA
25	Uncharacterized protein	29	84 476	BGIBMGA012315-PA
26	candidate olfactory receptor, <i>Bombyx mori</i>	31	22 846	BGIBMGA001505-PA
27	ubiquitin/ribosomal protein L40 fusion protein, <i>Bombyx mori</i>	279	15 072	BGIBMGA010604-PA
28	Gelsolin precursor, <i>Aedes aegypti</i>	27	84 873	BGIBMGA001730-PA
29	GA15482-PA, <i>Drosophila pseudoobscura</i>	52	16 980	BGIBMGA009969-PA
30	polyubiquitin	365	17 206	BGIBMGA001549-PA
31	PREDICTED; similar to CG1662-PA, <i>Apis mellifera</i>	35	24 578	BGIBMGA011829-PA
32	PREDICTED; similar to CG2999-PC, isoform C, <i>Tribolium castaneum</i>	27	222 506	BGIBMGA001566-PA
33	carboxylesterase, <i>Bombyx mori</i>	29	20 709	BGIBMGA000729-PA

对于非模式生物而言,选用一种合适的分析方法直接关系到蛋白质鉴定结果的准确性. 蛋白质组学的发展,单凭一种分析技术经常无法准确鉴定蛋白,通过使用不同的分析手段,可以起到互为补充的作用,有利于提高蛋白质鉴定的效率和准确度. 本实验在传统的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、Western Blot 的基础上,更建立了一种新的高灵敏度、高选择性快速的液相色谱串联质谱法(LC MS/MS)测定小菜蛾中泛素化蛋白的含量. LC MS/MS 联用的优点非常显著,首先液相色谱(LC)具有分离效率高、分析速度快、应用范围广等特点,生物大分子也能分离,而液相色谱(LC)与高选择性、高灵敏度的串联质谱(MS/MS)结合,更可完成对复杂样品进行实时分析,具有提纯和制备单一物质的能力<sup>[13]</sup>. LC MS/MS 可实现蛋白质的快速高灵敏度鉴别和测定,并在蛋白分子水平上进行直观的鉴定与比较.

本研究首先通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、Western Blot 的方法对小菜蛾敏感品系和抗性品系泛素化蛋白的表达差异进行了研究. 结果显示出 2 种品系的表达蛋白虽然存在一定的差异,但是差异结果并不明显,无法准确分别. 而之后利用 LC MS/MS 的方法,共鉴定出小菜蛾敏感品系泛素化蛋白 23 种,抗性品系泛素化蛋白 10 种,成功区别出 2 种品系的泛素化蛋白表达情况. 其中 5 种蛋白质为 2 个品系所共有的,分别是: candidate olfactory receptor、Ubiquitin/ribosomal protein L40 fusion protein、GA15482-PA、polyubiquitin、similar to CG1662-PA. 而在敏感品系特有的泛素化蛋白中,二氢硫辛酰胺脱氢酶

(Dihydrolipoamide dehydrogenase)<sup>[14]</sup>、热激蛋白(Heat shock protein)、碳酸酐酶(Carbonic Anhydrase family member)等蛋白在胁迫条件均发挥重要作用<sup>[15]</sup>。

综上所述,本研究首次采用串联质谱方法对泛素化蛋白进行鉴定,这对研究泛素在昆虫细胞中的功能具有重要意义,同时也为寻找害虫防治新策略提供基础。但是泛素化蛋白与耐药性之间的关系目前还不清楚,有关泛素的抗逆性情况还需要作进一步的探究和验证。

# [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Ciechanover A. The ubiquitin proteolytic system and pathogenesis of human diseases; a novel platform for mechanism-based drug targeting[ J ]. Biochem Soc Trans, 2003, 31 ( 2 ) : 474-481.
- [ 2 ] Hoeller D, Dikic I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy[ J ]. Nature, 2009, 458 ( 7237 ) : 438-444.
- [ 3 ] Pickart C M, Eddins M J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms[ J ]. Biochim Biophys Acta ( BBA ) - Mol Cell Res, 2004, 1695 ( 1 ) : 55-72.
- [ 4 ] Shelton A, Wyman J, Cushing N, et al. Insecticide resistance of diamondback moth( *Lepidoptera: Plutellidae* ) in North America [ J ]. J Econ Entomol, 1993, 86 ( 1 ) : 11-19.
- [ 5 ] 谢苗, 成娟, 尤民生, 等. 基于质谱和生物信息学分析的小菜蛾蛋白质鉴定[ J ]. 昆虫学报, 2009, 52 ( 11 ) : 1 206-1 212.
- [ 6 ] Liu C, Li F, Han Z. Studies on deltamethrin resistance breeding and its resistant mechanism of diamond back moth[ J ]. Acta Phytophy Sin, 1995, 22 ( 4 ) : 367-372.
- [ 7 ] Weill M, Berthomieu A, Berticat C, et al. Insecticide resistance; a silent base prediction [ J ]. Curr Biol: CB, 2004, 14 ( 14 ) : R552.
- [ 8 ] Bates S L, Zhao J Z, Roush R T, et al. Insect resistance management in GM crops: past, present and future[ J ]. Nat Biotechnol, 2005, 23 ( 1 ) : 57-62.
- [ 9 ] 张娜娜, 许勤, 李凤良, 等. 小菜蛾成虫蛋白质组双向电泳图谱的建立及条件优化[ J ]. 南京师大学报: 自然科学版, 2011, 34 ( 2 ) : 78-82.
- [ 10 ] Yun E Y, Goo T W, Hwang J S, et al. Bombyx mori ubiquitin mRNA[ J ]. GenBank Accession No AF308163, 2000.
- [ 11 ] 于航, 金丰良, 许小霞, 等. 德国小蠊泛素基因的克隆及序列分析[ J ]. 昆虫学报, 2004, 47 ( 4 ) : 522-525.
- [ 12 ] Cheng L G, Xu J N, Xue J, et al. Downregulation of ubiquitin gene expression in the deltamethrin-resistant diamondback moth ( *Plutella xylostella* L. ) [ J ]. Appl Entomol, 2009, 133 ( 7 ) : 533-538.
- [ 13 ] 黄强, 尹沛源, 路鑫, 等. 色谱-质谱联用技术在代谢组学中的应用[ J ]. 色谱, 2009, 27 ( 5 ) : 566-572.
- [ 14 ] Huo J, Shi H, Yao Q, et al. Cloning and purification of recombinant silkworm dihydrolipoamide dehydrogenase expressed in *Escherichia coli* [ J ]. Protein Expression Purif, 2010, 72 ( 1 ) : 95-100.
- [ 15 ] 刘凤沂, 须志平, 薄仙萍, 等. 昆虫抗药性与适合度[ J ]. 昆虫知识, 2008, 45 ( 3 ) : 374-378.

[ 责任编辑: 黄 敏 ]

( 上接第 107 页 )

- [ 6 ] Dudakovic A, Tong H, Hohl R J. Geranylgeranyl diphosphate depletion inhibits breast cancer cell migration[ J ]. Investigational New Drugs, 2011, 29 : 912-920.
- [ 7 ] Breitkopf K, Roeyen C, Sawitza I, et al. Expression patterns of PDGF-A, -B, -C and -D and the PDGF-receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in activated rat hepatic stellate cells( HSC ) [ J ]. Cytokine, 2005, 31 ( 5 ) : 349-357.
- [ 8 ] Roth-Eichhorn S, Eberheim A, Bode H P, et al. Transformation-dependent calcium influx by voltage-operated calcium channels in stellate cells of rat liver[ J ]. Journal of Hepatology, 1999, 30 : 612-620.
- [ 9 ] Shen N, Gong T, Wang J D, et al. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammatory responses are mediated by EGR-1/ GGPPS/ MAPK signaling[ J ]. The American Journal of Pathology, 2011, 178 ( 1 ) : 110-118.
- [ 10 ] K M C C, Hudock M P, Zhang R, et al. Inhibition of geranylgeranyl diphosphate synthase by bisphosphonates; a crystallographic and computational investigation[ J ]. J Med Chem, 2008, 51 : 5 594-5 607.
- [ 11 ] Terence F, McGuire, Qian Y M, et al. Platelet-derived growth factor receptor tyrosine phosphorylation requires protein geranylgeranylation but not farnesylation. [ J ] The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271 ( 44 ) : 27 402-27 407.

[ 责任编辑: 黄 敏 ]