



王帅, 朱克森, 都二霞. 蛋白质组学揭示美洲大蠊卵鞘在胚胎发育中的重要功能 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (1): 134 - 147.

蛋白质组学揭示美洲大蠊卵鞘 在胚胎发育中的重要功能

王 帅, 朱克森, 都二霞*

(华南师范大学生命科学学院, 昆虫科学与技术研究所, 广东省昆虫发育生物学与应用技术重点实验室,
广州市昆虫发育与应用技术重点实验室, 广州 510631)

摘要: 作为世界性的卫生害虫, 美洲大蠊 *Periplaneta americana* 对环境有惊人的适应性和极强的繁殖力, 其强大的繁殖能力以及卵鞘对胚胎发育的有效保护, 是其防治困难的内在原因。本研究以美洲大蠊卵鞘为研究对象, 利用 Label-free 定量技术提取前期和中期的美洲大蠊卵鞘蛋白, 检验合格后的蛋白溶液通过酶解, 液质联用检测技术后, 利用 MaxQuant 软件对下机数据进行蛋白质鉴定和 label-free 定量分析, 对差异蛋白进行 GO 功能注释和 KEGG 代谢通路富集分析, 并讨论不同发育时期美洲大蠊蛋白质组的表达差异。结果显示, 在美洲大蠊前期和中期卵鞘中共鉴定出 754 个蛋白, 其中总差异蛋白 220 个, 157 个存在显著性差异, 与新鲜卵鞘相比, 中期卵鞘中表达量上调的蛋白 102 个, 下调的 55 个。这些差异蛋白主要富集在生物代谢通路、蛋白质合成、胞吐、黏蛋白类、蛋白合成与降解、免疫等过程, 它们与卵鞘的形成, 胚胎发育时期的保水、免疫等功能密切相关。本研究为进一步研究美洲大蠊卵鞘功能奠定了基础, 为美洲大蠊的生物防治提供科学依据。

关键词: 美洲大蠊; 卵鞘; 蛋白组; label-free; 富集分析

中图分类号: Q965; S89

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 01-0134-12

Proteome profiling reveals oothecal function during embryogenesis in the American cockroach, *Periplaneta americana*

WANG Shuai, ZHU Ke-Sen, DU Er-Xia* (Guangdong Provincial Key Laboratory of Insect Developmental Biology and Applied Technology, Guangzhou Key Laboratory of Insect Development Regulation and Application Research, Institute of Insect Science and Technology, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: *Periplaneta americana*, as a world-wide sanitary pest, has amazing adaptability to the environment and strong fecundity. Its strong reproductive ability and ootheca occurrence are the internal reasons against pest control. In this study, the non-labeled quantitative proteomics were employed to compare the differential proteins of oothecae between D1 and D20. Briefly, extracted the proteins and detected them by HPLC/MS technology. After identified by MaxQuant software and label-free quantitative analysis, the differential proteins were further performed with GO function annotation and KEGG metabolic pathway enrichment analysis. The results showed that total of 754 proteins were identified, of which 157 proteins are significantly different. Among them, there were 102 up-regulated proteins and 55 down-regulated proteins. These differential proteins were mainly enriched in immunity, water retention, ootheca

基金项目: 国家自然科学基金 (3172021)

作者简介: 王帅, 女, 1995 年生, 在读研究生, 研究方向为美洲大蠊生殖及进化, E-mail: shuai_w0210@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 都二霞, 博士, 副研究员, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: duerxia@m.scnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-10-26; 接受日期 Accepted: 2021-01-10

formation, ect. These data would provide a scientific basis for both ootheca function and the biological control of American cockroach.

Key words: *Periplaneta americana*; ootheca; proteome; label-free; enrichment analysis

美洲大蠊 *Periplaneta americana* 隶属于节肢动物门 Phylum arthropoda 昆虫纲 Insecta 有翅亚纲 Pterygota 蜚蠊目 Blattaria, 俗称蟑螂, 素有“小强”之称, 早在 3.5 亿年前就已存在, 是地球上最古老的昆虫类群之一。美洲大蠊应对环境惊人的适应性和极强的繁殖力, 使其成为广东乃至华南地区室内卫生害虫的霸主, 也是世界上公认的病媒 (Bell and Adiyodi, 1982; Ali *et al.*, 2017)。对于绝大部分蟑螂来说, 它们的生命周期中都要经历一个特殊的阶段 - 胚胎发育, 在这一时期, 卵鞘几乎是卵的唯一屏障, 它不仅为胚胎提供水分、氧气, 还可以抵御外界的机械保护, 防止水分及药剂进入等, 对幼虫的孵化至关重要。因此, 卵鞘是蜚蠊目昆虫重要适应性的生殖策略。

美洲大蠊卵鞘是一种椭圆形、半圆柱状的结构, 保护卵粒和完成整个胚胎发育过程。卵鞘由凸起的外表面及凹陷的内表面组成的两瓣结构, 中间由锯齿状的嵴连接。嵴保证卵鞘内部与外界环境的气体物质交换 (Maya *et al.*, 2002), 同时也是幼虫孵出的位置。

性成熟后的雌性成虫以孤雌生殖或两性方式产卵, 产卵时左右粘液腺分泌物在生殖前庭混合反应后包裹卵粒排出体外, 最终形成褐色坚硬且具有保护作用的结构, 即卵鞘 (Pryor, *et al.*, 1946)。较大的左侧粘液腺可分泌 3, 4 - 二羟基苯甲酸 (原儿茶酸), 一种酚类葡萄糖苷, 作为黑化反应前体 (Wills and Brunet *et al.*, 1966)。除此之外, 左侧粘液腺也可以分泌草酸钙 (Stay *et al.*, 1960), 以及卵鞘蛋白 (Pau *et al.*, 1968), 研究表明, 草酸钙的含量与粘液腺的分泌功能有一定的关联 (Stay *et al.*, 1960)。右侧粘液腺主要分泌葡萄糖苷酶 (Avila *et al.*, 2011), 当左右粘液腺分泌物混合时, 葡萄糖苷酶可水解葡萄糖苷 (Brunet and Kent, 1955) 生成原儿茶酸, 原儿茶酸进一步被氧化形成醌类化合物 (Whitehead *et al.*, 1960; Bell and Adiyodi, 1982; Whitehead, 2011), 最后, 醌类化合物与结构蛋白交联, 使卵鞘硬化。除此之外, 多酚氧化酶 (Sugumaran and Nellaiappan, 1990), 漆酶等物质也参与了卵鞘黑化硬化的过程 (Whitehead *et al.*, 1960; Whitehead *et al.*, 1969)。

新的研究发现, 附着在左侧粘液腺上的血细胞在原儿茶酸的合成过程中至关重要, 当洗掉血细胞后, 左侧粘液腺就不能使酪氨酸脱羧 (Lake and Mills, 1975; Whitehead, 2011)。左右粘液腺均有不同亚型的上皮细胞和分泌细胞 (Bell and Adiyodi, 1982; Courrent *et al.*, 2008)。

目前, 对于美洲大蠊卵鞘的蛋白及其功能仍未系统研究, 本研究利用 Label-free 定量技术对美洲大蠊卵鞘不同发育时期的差异蛋白进行鉴定及聚类分析, 首次从蛋白质组学水平揭示调控美洲大蠊卵鞘蛋白合成的关键调控酶及结构蛋白, 不仅揭示美洲大蠊卵鞘对胚胎的保护功能的科学奥秘, 也将推动蟑螂卫生害虫防治领域的进程。

1 材料与方法

1.1 材料

选用华南师范大学昆虫发育生物学与应用技术重点实验室所饲养的美洲大蠊产生的卵鞘, 卵鞘从产出到幼虫孵化需要 40 d, 选取刚产出的卵鞘定为前期卵鞘 (Day 1), 第 20 天卵鞘定为中期卵鞘 (Day 20), 每个时期卵鞘取样重复 3 次, 共 6 个样品。

1.2 美洲大蠊卵鞘蛋白的提取

将两个时间的卵鞘轻轻移除内部卵粒, PBS 缓冲液中清洗后加入 RAPI 强裂解液和 100 mM PMSF 蛋白酶抑制剂, 用钢珠超声打碎, 冰上裂解 30 min。4℃ 最大速离心 20 min, 取上清即获蛋白, 供下一步的检测和组学鉴定。

1.3 美洲大蠊不同发育时期卵鞘蛋白组 label-free 检测

用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质的浓度并定量后分装样品, 检测浓度合格后, 各样品分别取 30 μ L 蛋白质溶液, 各自加入 DTT 和碘乙酰胺对蛋白质溶液进行二硫键断裂、还原烷基化处理, 随后各样品加入 40 μ L 胰蛋白酶 Trypsin 酶解蛋白, 收集好的滤液样品采用 nano-HPLC-MS/MS (Thermo Q Exactive) 液质联用技术进行分析, 数据采集模式为数据依赖采集模式 DDA (Data dependent acquisition)。

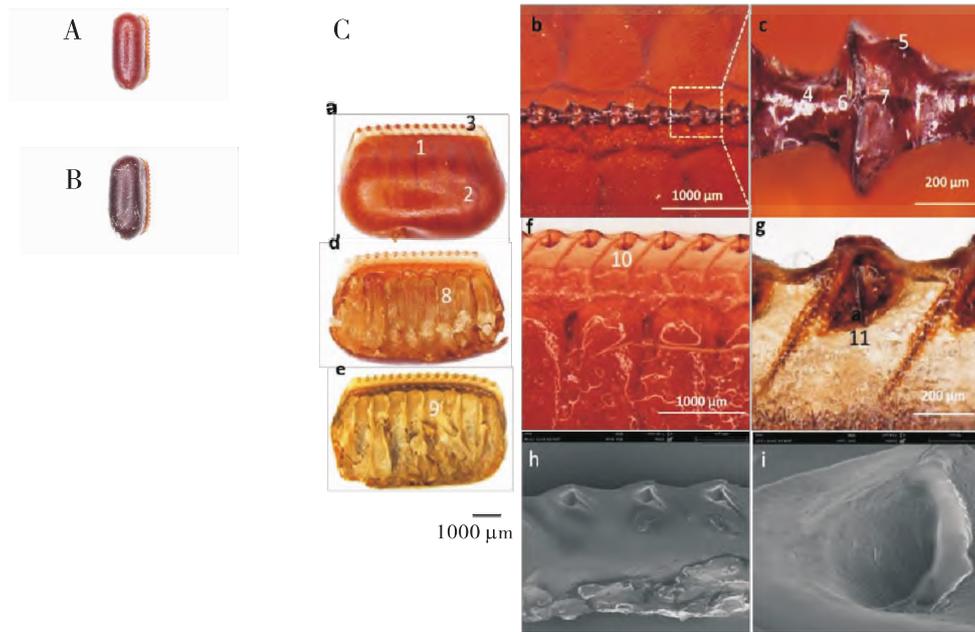


图 1 美洲大蠊卵鞘形态图

Fig. 1 Morphology of oothecae of *Periplaneta americana*

注: A 为卵鞘前期 (第 1 天) 形态图, B 为卵鞘中期 (第 20 天) 形态图, C 为卵鞘细节观察。(a) 1, 分割的卵室; 2, 凸起的外表面; 3, 嵴; (b), 嵴上拉链锯齿状结构。(c), 嵴部正面观。4, 嵴前端的颈部; 5, 嵴顶端闭合处; 6, 嵴前端部分; 7, 嵴后端部分; (d), 卵鞘内部。8, 卵; (e), 幼虫孵出后卵鞘内部。9, 内部微绒毛; (f), 去掉微绒毛的卵鞘内部结构。10, 通道结构内部; 11, 通道结构外部; (g), 嵴。(h-i), 嵴部电镜图。Note: The morphological picture of the early ootheca (Day 1) (A) and (Day 20) (B). (C), Details of oothecae. (a), Mosaic assembly of the oothecae 1, adjacent segmentations; 2, Convex external surface; 3, Crest; (b), Zipper-like toothed rail structure of the crest. (c), Details shows the crest. 4, Neck; 5, Closed area of the crest; 6, Pre-dental elements; 7, Post-dental elements; (d), The inner side of the ootheca 8, numph; (e), The inner surfaces of ootheca after numph hatched; 9, Inner structure; (f), The surfaces without inner structure. Channel like structure of inside (10) and outer side (11); (g), Crest; (h-i), SEM of crest.

1.4 美洲大蠊卵鞘蛋白组 label-free 数据分析

1.4.1 原始数据转换

质谱鉴定分析后的下机原始数据, 通过 pFind 3.1 对数据进行提取、解析并去除同位素, 然后转换为 Mascot Generic Format (MGF) 格式文件。

1.4.2 MaxQuant v1.5 进行蛋白质鉴定和 label-free 定量分析

用软件 MaxQuant v1.5 与已发表的美洲大蠊基因组蛋白质数据库进行比对, 得到蛋白质鉴定结果, 相关参数如表 1, 首先在谱图/肽段水平进行 1% FDR 的过滤 (PSM-level FDR \leq 0.01), 获得具有显著性的谱图和肽段列表。为了控制蛋白的假阳性率, 以 FDR 1% 再次进行过滤 (Protein-level FDR \leq 0.01), 最终用于蛋白质定量分析的肽段谱图数最少为 1, 同时通过质控分析来判断实验数据是否合格。

表 1 MaxQuant 搜索参数信息表

Table 1 Parameters searched by MaxQuant

项目 Item	参数 Value
Type of search (搜索方式)	MS/MS Ion search
Enzyme (蛋白酶)	Trypsin/P
Fixed modifications (固定修饰)	Carbamidomethyl (C)
Variable Modifications (可变修饰)	Oxidation (M); Acetyl (Protein N-term)
Database (数据库)	pame. OGS1. pep. fa
Instrument type (仪器类型)	Q Exactive
Peptide Spectrum Match Level FDR (肽段谱图比对检验值 FDR)	0.01
Protein Level FDR (蛋白比对检验值 FDR)	0.01
Quantification (定量方法)	iBAQ
Others (其他参数)	Default

1.4.4 差异蛋白 GO 和 KEGG 富集分析

通过 $P < 0.05$ 和 $FDR < 0.01$ 对差异蛋白进行筛选, 从定量结果中筛选出样品间的显著差异蛋白。随后对差异蛋白进行 GO、Pathway 富集分析, 利用 Blast2GO 对目标蛋白质集合进行 GO 以及 KOG 注释, 利用 KAAS 软件对目标蛋白质集合进行通路注释。GO 功能显著性富集分析主要通过所有鉴定到的蛋白质背景相比, 差异蛋白质中显著富集的 GO 功能条目, 从而给出差异蛋白质与哪些生物学功能显著相关。Pathway 显著性富集分析方法是 KEGG 通路为单位, 应用超几何检验, 找出与所有鉴定到的蛋白背景相比, 在差异蛋白中显著富集的通路, 从而确定差异蛋白参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。

2 结果与分析

2.1 美洲大蠊卵鞘不同发育时期的蛋白质鉴定

选取美洲大蠊第 1 天和第 20 天卵鞘提取蛋白, 每个时期 3 次重复, 共 2 组 6 个样品, 分别命名为: Pa_o_p1 (primary)、Pa_o_p2 (primary)、Pa_o_p3 (primary)、Pa_o_m1 (middle)、Pa_o_m2

(middle)、Pa_o_m3 (middle)。质检合格后上机, 蛋白组检测共生成 18 882 张二级谱图, 鉴定出 4 324 条肽段和 754 个蛋白 (1% FDR, 表 2), 其中前期卵鞘中鉴定特异蛋白数目 40 个, 中期中 111 个, 而前中期共有的蛋白 67 个。以美洲大蠊卵鞘 D1 与 D20 其中一个样品为例, 特异性肽段数目分布图显示, 在前期鉴定到的 90 个蛋白中, 特异性肽段数目为 1 的蛋白约占总蛋白的 41.11%, 在中期鉴定到的蛋白中特异性肽段数目为 1 的蛋白约占总蛋白的 41.03%, 蛋白数量随着匹配肽段数量的增加而不断减少 (图 2-A, D); 蛋白质相对分子量分布图显示, 美洲大蠊卵鞘前期分子质量大小在 21 ~ 40 kDa 之间的蛋白质较多, 占有检测蛋白的 41.11%, 其次是分子质量大小在 0 ~ 30 kDa, 占有检测蛋白的 27.78%, 美洲大蠊卵鞘中期蛋白质相对分子量分布图显示在 21 ~ 40 kDa 之间的蛋白质同样最多, 占有检测蛋白的 41.11%, 其次是 41 ~ 60 kDa, 占有检测蛋白的 26.92% (图 2-B, E); 肽段长度分布图显示, 美洲大蠊卵鞘前期和中期鉴定到的肽段长度主要集中在 8 ~ 16 aa 之间 (图 2-C, F)。此外, 3 次重复检测结果类似, 表明检测到的蛋白可信度较高。

表 2 美洲大蠊卵鞘两个时期的蛋白质组学鉴定结果

Table 2 Identified proteins from one-day-old and twenty-day-old oothecae of *Periplaneta americana*

样品名称 Sample name	鉴定的蛋白数目 Identified proteins	鉴定的肽段数目 Identified peptides	鉴定的谱图数目 Identified spectra
Pa_o_p1	90	638	2 062
Pa_o_p2	99	655	2 147
Pa_o_p3	90	622	2 012
Pa_o_m1	156	812	4 119
Pa_o_m2	158	791	4 162
Pa_o_m3	161	806	4 380
Pa_o	754	4 324	18 882

注: Pa_o_p 为美洲大蠊卵鞘前期, Pa_o_m 为美洲大蠊中期, Pa_o 为美洲大蠊前期和中期蛋白总数目。Note: Pa_o_p was the prophase of *P. americana*, Pa_o_m was the middle period of *P. americana*, Pa_o was the total number of proteins in the prophase and mid-term of *P. americana*.

表 3 美洲大蠊卵鞘不同发育时期蛋白鉴定数量比较

Table 3 Differential proteins between one-day-old and twenty-day-old oothecae of *Periplaneta americana*

比较组名称 p/m	前期特异蛋白数 Number of P specific proteins	中期特异蛋白数 Number of m specific proteins	共有蛋白数 Common proteins
Pa_o_p_VS_Pa_o_m	40	111	67

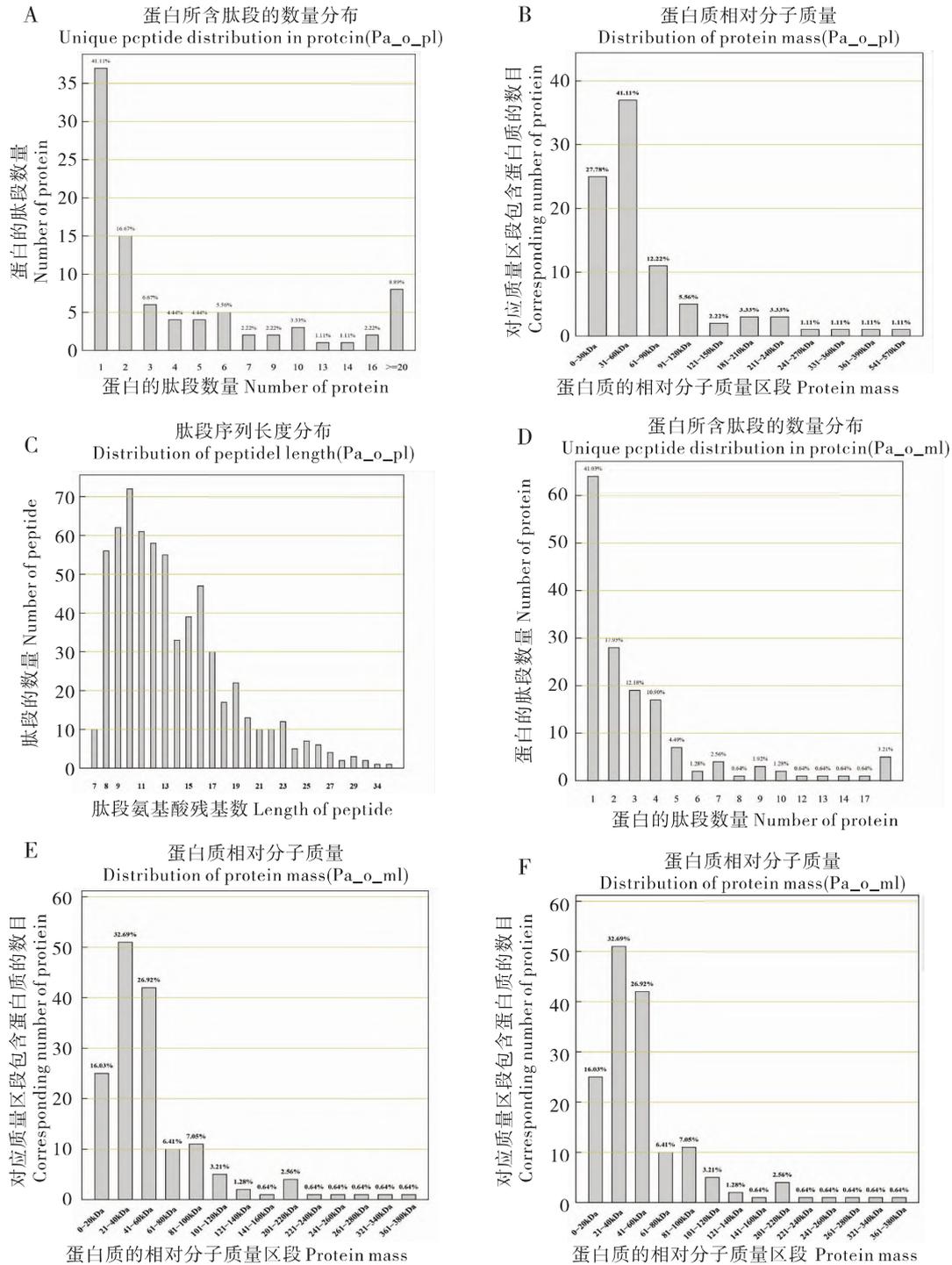


图2 美洲大蠊不同发育时期卵鞘蛋白的基本情况

Fig. 2 Basic situation of ovarian protein in different periods of *Periplaneta americana*

2.3 蛋白表达功能聚类

Gene Ontology (简称 GO) 是一个国际化的基因功能分类体系, 提供了一套动态更新的标准词汇表 (Controlled Vocabulary) 来全面描述生物体中基因和基因产物的属性。GO 总共有 3 个本体 (Ontology), 分别描述参与的生物过程 (Biological Process)、所处的细胞位置 (Cellular

Component)、基因的分子功能 (Molecular Function)。利用 Blast2GO 软件将所有鉴定到的蛋白质与已发表的美洲大蠊蛋白质数据库进行比对, 得到相应的 GO 功能注释 (图 3)。在生物过程方面, 鉴定到的蛋白主要参与代谢过程 (Metabolic process)、细胞过程 (Cellular process) 和单细胞过程 (Signal-organism process), 它们的数目分别

为 30、33、31。在细胞组分方面，蛋白主要富集在细胞 (Cell)、膜 (Membrane)、细胞器 (Organelle) 和细胞部分 (cell part) 中；在分子功能方面，注释结果显示共有 84 个蛋白主要在催化

活性 (Catalytic activity) 和结合活性 (Binding) 中富集，可以通过与 ATP、GTP、DNA、RNA 和金属离子的结合从而来发挥功能。

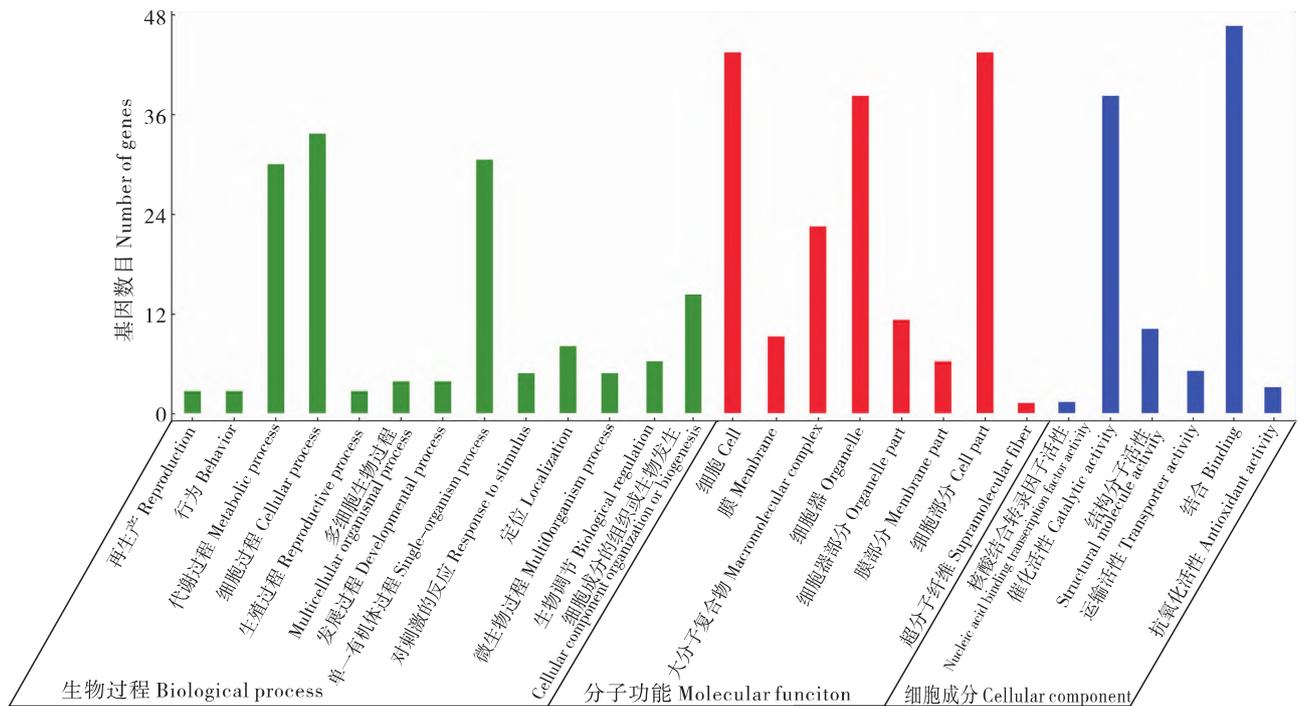


图 3 美洲大蠊卵鞘蛋白的 GO 功能注释

Fig. 3 GO function annotation of *Periplaneta americana* egg sheath protein

注: 深绿色代表生物过程, 红色代表细胞位置, 蓝色代表基因的分子功能, 纵坐标为基因数目。Note: Dark green represented biological processes, red represented cell component, blue represented the molecular function of genes, and the ordinate was the number of genes.

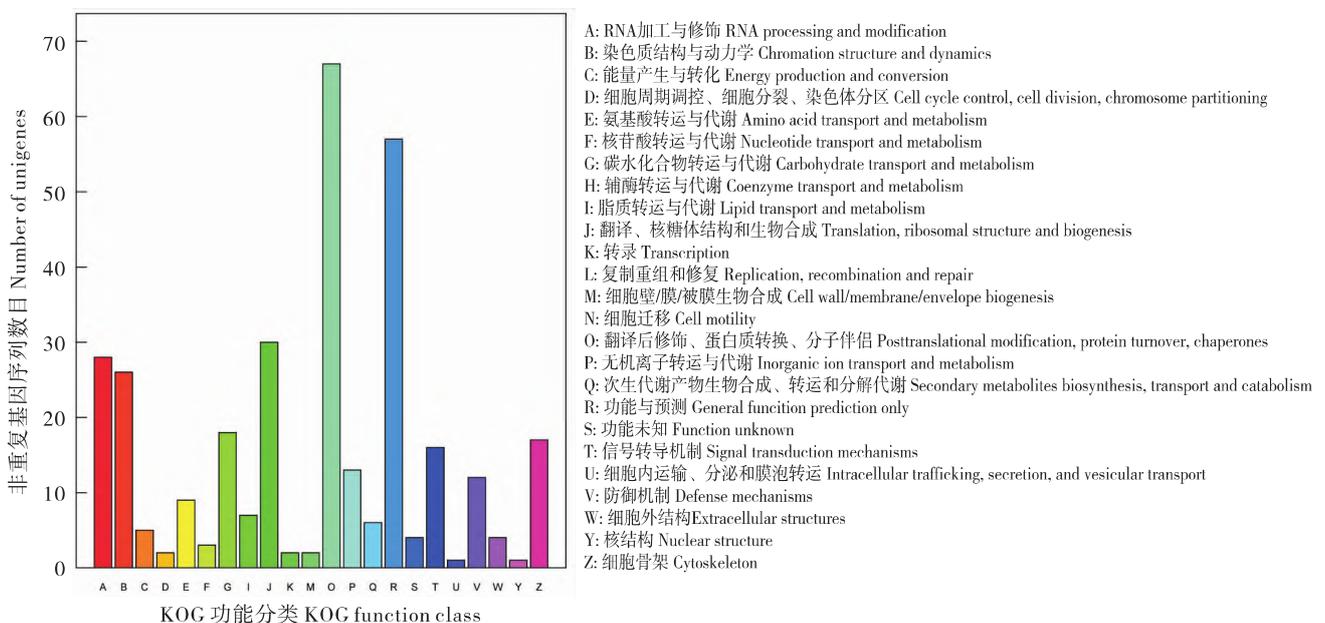


图 4 美洲大蠊卵鞘蛋白的 KOG 功能注释

Fig. 4 KOG function annotation of *Periplaneta americana* egg sheath protein

KOG (Eukaryotic of Orthologous Groups of Proteins 蛋白相邻类的聚簇) 是对蛋白质进行直系同源分类的数据库, 构成每个 KOG 的蛋白都是被假定为来自于一个祖先蛋白, 并且因此或者是直系同源蛋白或者是旁系同源蛋白。直系同源蛋白是指来自于不同物种的由垂直家系 (物种形成) 进化而来的蛋白, 并且典型的保留与原始蛋白有相同的功能。旁系同源蛋白是那些在一定物种中的来源于基因复制的蛋白, 可能会进化出新的与原来有关的功能。将所有鉴定到的蛋白和 KOG 数据库进行比对, 结果显示, 在一般功能预测 (general function prediction only, 57 个) 和翻译后

的修饰、蛋白周转、分子伴侣 (posttranslational modification, protein turnover, chaperones, 67 个) 2 个方面聚集的最多, 在细胞内转运、分泌、小泡运输 (Inorganic ion transport and metabolism, 1 个) 和核结构 (cell motility, 1 个) 最少。

KEGG 注释结果显示: 106 个美洲大蠊卵鞘蛋白在 KEGG 数据库中有功能注释, 共参与了 56 条代谢通路, 其中, 最主要的代谢通路是代谢途径和内质网中的蛋白质合成, 分别有 25 (23.58%) 和 18 (16.98%) 个蛋白参与, 主要体现在能量合成 (表 4)。

表 4 美洲大蠊卵鞘蛋白的 KEGG 通路分析

Table 4 Analysis of the KEGG pathway of *Periplaneta americana* oothecae proteins

路径 Pathway	有路径注释的蛋白 Proteins with pathway annotation (106)	路径 ID Pathway ID	
代谢途径	Metabolic pathways	25 (23.58%)	ko01100
蛋白质合成	Protein processing in endoplasmic reticulum	18 (16.98%)	ko04141
吞噬体	Phagosome	16 (15.09%)	ko04145
长寿调节途径	Longevity regulating pathway	16 (15.09%)	ko04213
核糖体	Ribosome	13 (12.26%)	ko03010
溶酶体	Lysosome	13 (12.26%)	ko04142
剪接体	Spliceosome	11 (10.38%)	ko03040
碳代谢	Carbon metabolism	9 (8.49%)	ko01200
MAPK 信号通路	MAPK signaling pathway	8 (7.55%)	ko04010
胞吞作用	Endocytosis	8 (7.55%)	ko04144
过氧化物酶体	Peroxisome	7 (6.6%)	ko04146
长寿调节途径 - 蠕虫	Longevity regulating pathway-worm	7 (6.6%)	ko04212
半乳糖代谢	Galactose metabolism	6 (5.66%)	ko00052
药物代谢	Drug metabolism	6 (5.66%)	ko00983
磷酸戊糖途径	Pentose phosphate pathway	5 (4.72%)	ko00030
嘧啶代谢	Pyrimidine metabolism	5 (4.72%)	ko00240
色氨酸代谢	Tryptophan metabolism	5 (4.72%)	ko00380
乙醛酸和二羧酸的代谢	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	5 (4.72%)	ko00630
FoxO 信号通路	FoxO signaling pathway	5 (4.72%)	ko04068
自噬 - 动物	Autophagy - animal	5 (4.72%)	ko04140
Hippo 信号通路	Hippo signaling pathway	5 (4.72%)	ko04391

续表 4 Continued table 4

	路径 Pathway	有路径注释的蛋白 Proteins with pathway annotation (106)	路径 ID Pathway ID
糖酵解/糖异生	Glycolysis / Gluconeogenesis	3 (2. 83%)	ko00010
果糖和甘露糖代谢	Fructose and mannose metabolism	3 (2. 83%)	ko00051
嘌呤代谢	Purine metabolism	3 (2. 83%)	ko00230
谷胱甘肽代谢	Glutathione metabolism	3 (2. 83%)	ko00480
其他聚糖降解	Other glycan degradation	3 (2. 83%)	ko00511
氨基酸的生物合成	Biosynthesis of amino acids	3 (2. 83%)	ko01230
真核生物核糖体生物发生	Ribosome biogenesis in eukaryotes	3 (2. 83%)	ko03008
RNA 转运	RNA transport	3 (2. 83%)	ko03013
钙信号通路	Calcium signaling pathway	3 (2. 83%)	ko04020
光电转换	Phototransduction	3 (2. 83%)	ko04745

2.4 蛋白质定量

将美洲大蠊卵鞘前期 3 次重复鉴定的总蛋白与中期 3 次重复测序鉴定的总蛋白设置为比较组, 利用 MaxQuant 软件对鉴定到的蛋白质进行定量。依据蛋白质丰度水平, 设置差异倍数 ≥ 1.2 倍且 $P < 0.05$, 筛选差异蛋白, 最终得到显著差异蛋白数目 (见图 5)。在美洲大蠊卵鞘发育的前期和中期, 共有 220 个蛋白的表达量发生变化。其中差异蛋白 157 个, 与新鲜卵鞘相比, 在卵鞘发育到第 20 天, 有 102 个蛋白质表达上调, 远远多于 55 个下调蛋白质的数目 (图 5)。

2.5 差异蛋白的富集分析

将上述鉴定的差异蛋白进行 GO 富集分析, 在生物过程中, 美洲大蠊卵鞘差异蛋白主要富集到细胞过程 (cellular process, 15 个)、代谢过程 (metabolic process, 10 个)、单细胞过程 (single-organism process, 13 个) 等; 在细胞组分中, 美洲大蠊卵鞘差异蛋白主要富集到细胞 (cell, 14 个)、细胞内 (cell part, 14 个) 和细胞器 (organelle, 13 个); 在分子功能方面, 美洲大蠊卵鞘差异蛋白主要富集到催化活性 (catalytic activity, 17 个) 和结合活性 (binding activity, 13 个) (图 6)。同时美洲大蠊卵鞘差异蛋白的 Pathway 富集分析发现, Pa_o_p-vs-Pa_o_m 差异蛋白主要的富集通路是代谢途径 (Metabolic pathways)、溶酶体 (Lysosome)、长寿调节途径

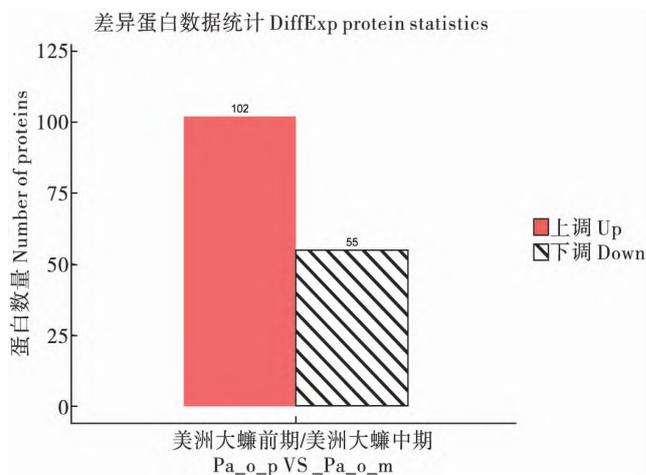


图 5 美洲大蠊卵鞘蛋白前期和中期间的显著差异蛋白数目比较

Fig. 5 Up-regulated and down-regulated proteins in 20-day-old oothecae in comparison with 1-day-old

(Longevity regulating pathway) 以及碳代谢 (Carbon metabolism) (图 7)。

通过两个不同时期的卵鞘蛋白定量热图发现, 与前期新鲜卵鞘蛋白相比, 中期卵鞘中热休克蛋白, 核糖体蛋白及一些卵黄蛋白增加 (图 8), 说明这些可能参与了应激, 新蛋白的合成和能量代谢, 而中期中一些漆酶, 丝氨酸蛋白酶抑制剂。葡萄糖脱氢酶及其受体与黑化硬化相关的显著下降, 说明这些在前期鞘形成中起关键作用, 因此害虫防治要考虑卵鞘前期的蛋白作为分子靶标。

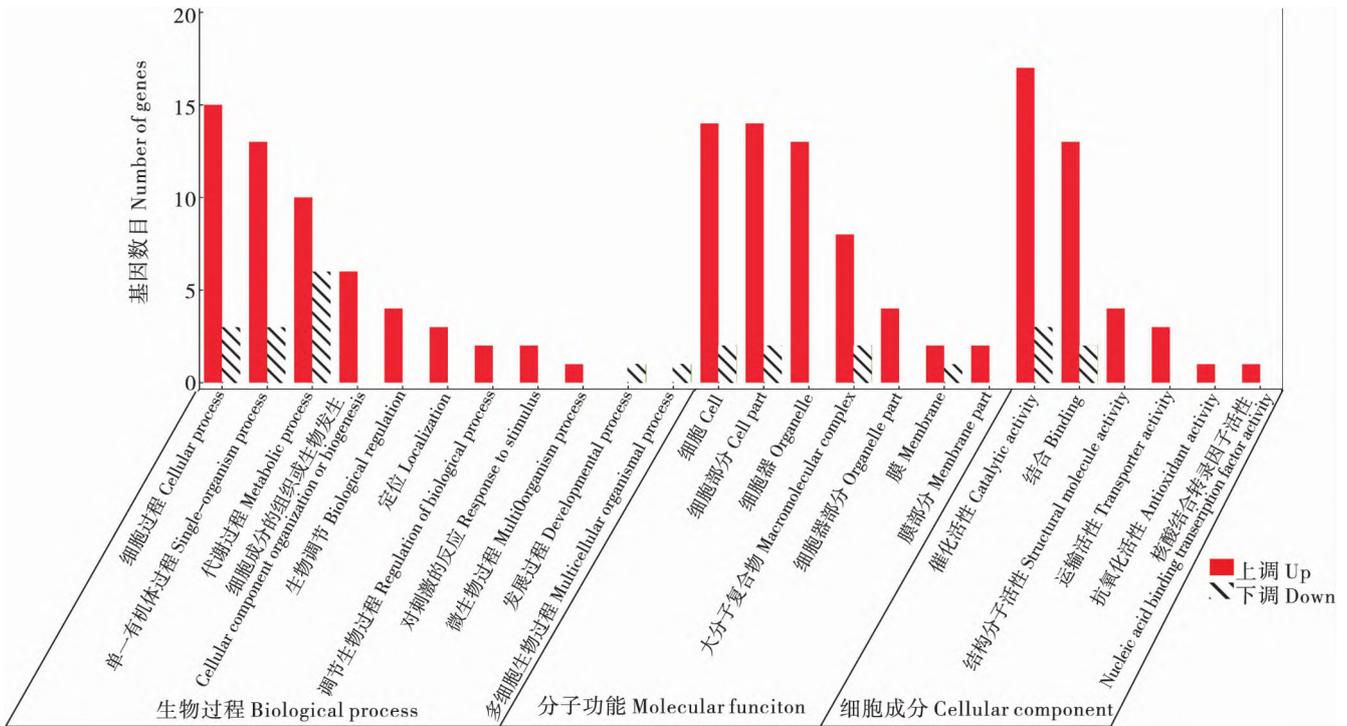


图 6 美洲大蠊卵鞘不同发育时期差异蛋白的 GO 富集分析

Fig. 6 GO enrichment of differential proteins in *Periplaneta americana* oothecae on day1 and day20

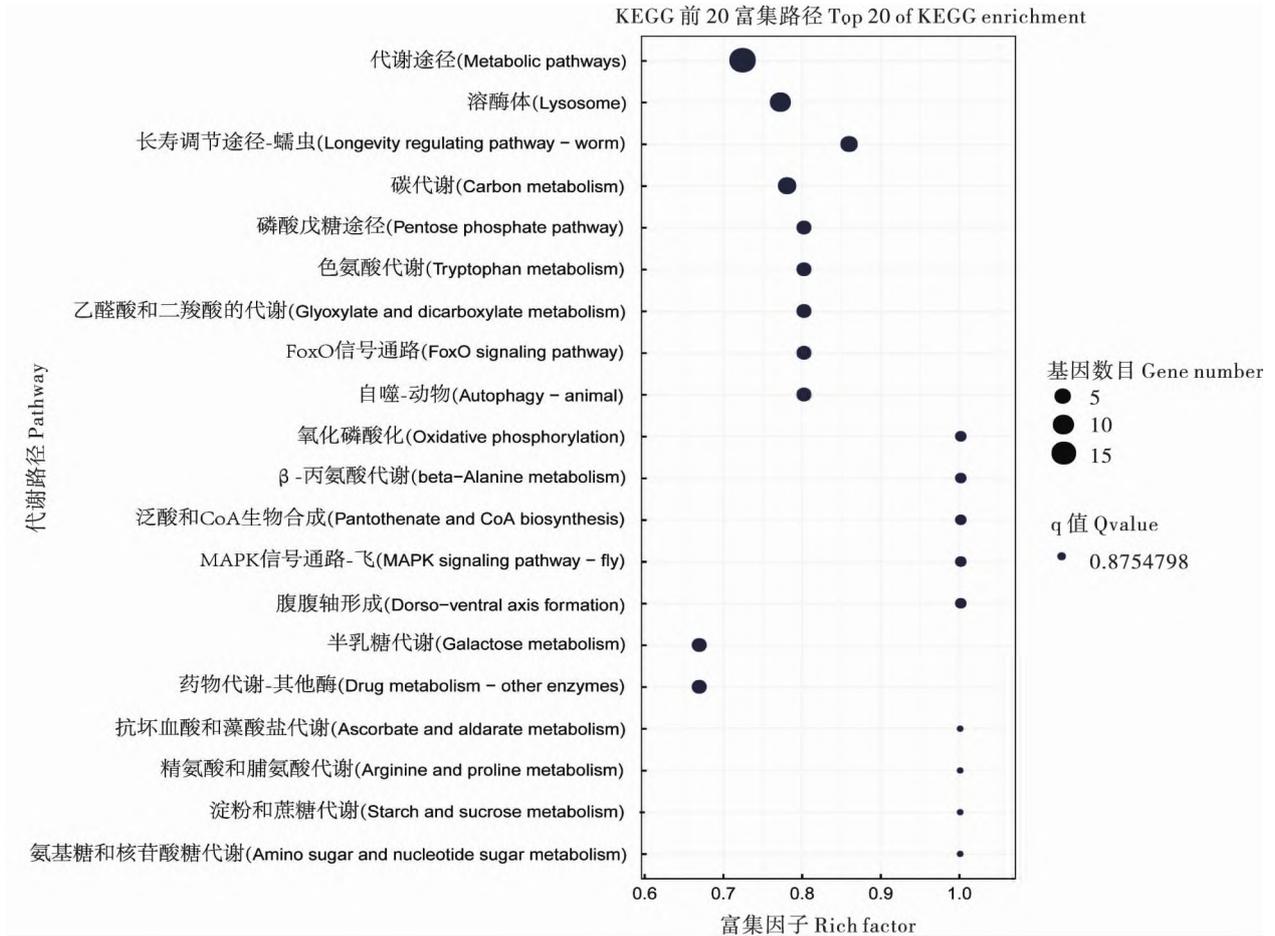


图 7 美洲大蠊卵鞘不同发育时期差异蛋白的 KEGG 富集分析

Fig. 7 KEGG enrichment of differential proteins in *Periplaneta americana* oothecae on day1 and day20

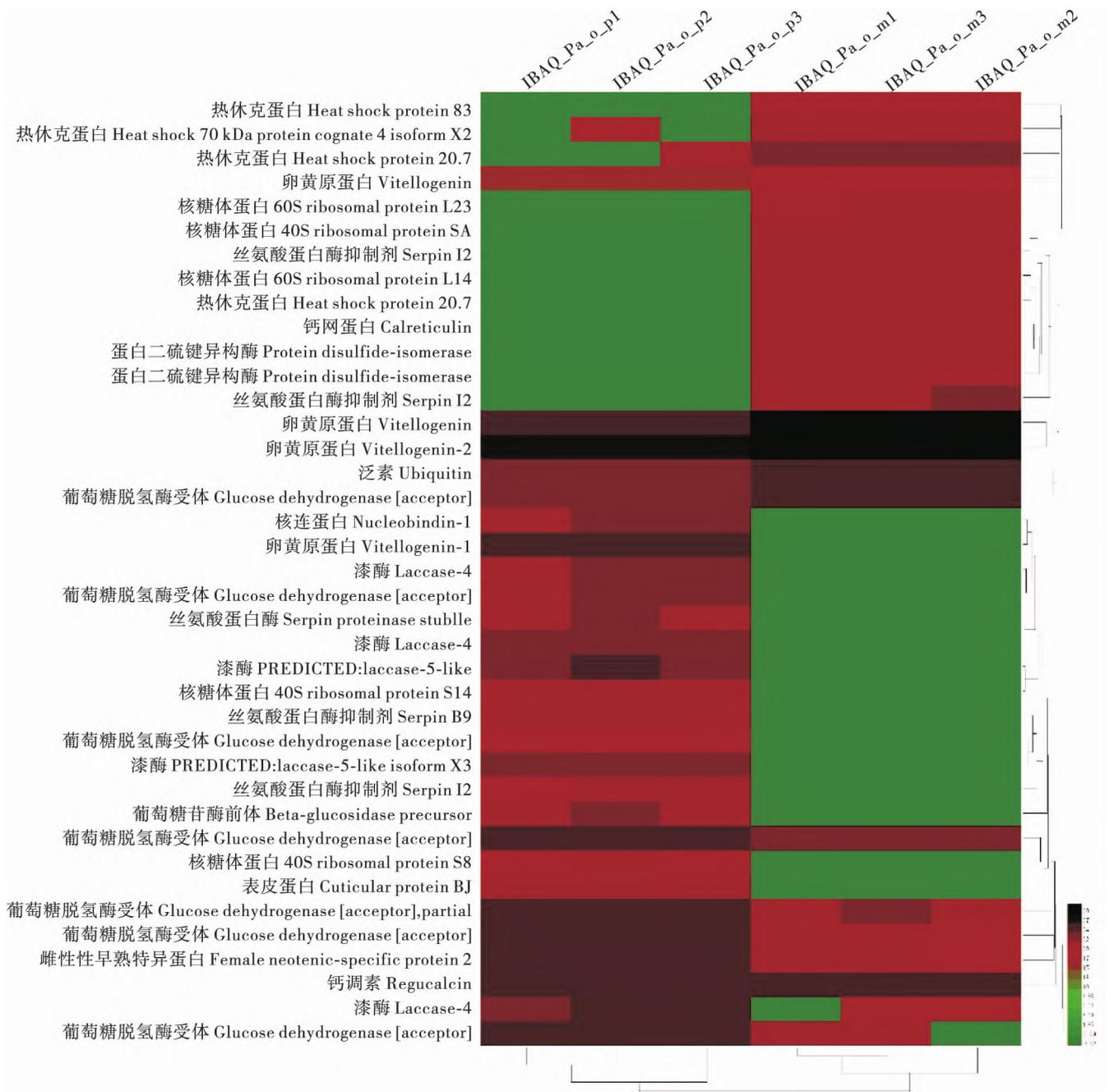


图8 卵鞘形成相关差异蛋白聚类分析

Fig. 8 Cluster analysis of different proteins related to oocyte formation

3 结论与讨论

美洲大蠊作为世界性的卫生害虫,对外界环境有惊人的适应性和极强的繁殖力,是广东乃至华南地区室内卫生害虫的霸主。美洲大蠊兼具孤雌生殖和两性生殖两种方式,同时卵鞘为胚胎的屏障,有效阻止了药剂的渗入和防止了水分的流失,加上化学灭蟑药的使用导致蟑螂的抗药性不

断增加,使得蟑螂的防治不尽如人意,因此,本文对不同发育时期美洲大蠊卵鞘进行了蛋白质组学分析,寻找卵鞘的功能蛋白,为卵鞘对胚胎的功能研究奠定基础,进而为害虫生物防治提供科学依据。

本研究利用非定量标记的方法对美洲大蠊2个不同发育时间(产出卵鞘第1天到第20天)的卵鞘蛋白进行了定量分析,对鉴定得到754个卵鞘蛋白的相对分子量、氨基酸肽段长度和特异性

肽段数目的统计分析均表明测得的蛋白质组数据质量较高。GO 功能注释分析发现, 754 个美洲大蠊卵鞘蛋白中共有 84 个蛋白主要在催化活性 (Catalytic activity) 和结合活性 (Binding) 中富集, 这包括催化脂肪酸以及卵鞘结构蛋白的合成与代谢、能量转运与储存、卵鞘黑化硬化的一系列酶。KEGG 通路分析发现, 有 106 个非冗余美洲大蠊卵鞘蛋白直接参与了与主要生化代谢途径和信号转导途径相关的 27 条代谢途径。

通过 Label-free 定量分析发现, 在美洲大蠊卵鞘 2 个不同发育时期中共有 220 个美洲大蠊卵鞘蛋白的表达量发生了变化, Pa_o_p-vs-Pa_o_m 中有 157 个样品间差异蛋白, 进一步注释发现与卵鞘形成过程相关类型的蛋白有 20 个, 有 102 个蛋白质表达上调, 远远多于 55 个下调蛋白的数目。对不同生长时期的美洲大蠊卵鞘差异蛋白的 KEGG 富集分析发现, 主要的富集通路是代谢途径 (Metabolic pathways)、溶酶体 (Lysosome)、长寿调节途径 (Longevity regulating pathway) 以及碳代谢 (Carbon metabolism), 差异蛋白的 GO 富集分析发现, 美洲大蠊卵鞘差异蛋白在分子功能上主要富集到在催化活性 (catalytic activity) 和结合活性 (binding), 这些酶的表达量的显著变化可能在调控美洲大蠊卵鞘形成过程中可能发挥着关键作用。

基于 label-free 非定量标记技术, 通过对两个发育时期的卵鞘蛋白质组数据进行比较, 筛选得到含量较高的差异蛋白: 如热休克蛋白、低密度脂蛋白、钙调蛋白、黏蛋白、漆酶、葡萄糖脱氢酶、丝氨酸蛋白酶等。其中漆酶 (Asano *et al.*, 2019)、丝氨酸蛋白酶已经证明在表皮的黑化和硬化中起到关键作用 (Dittmer *et al.*, 2004; Gorman *et al.*, 2008; Futahashi *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2013), 可能也参与卵鞘的黑化和硬化; 而黏蛋白与卵鞘保水相关。黏蛋白是分布在各种管腔, 高度糖基化的粘蛋白具有相当的保水能力, 并通过吸收大量水分形成凝胶, 结构中包含半胱氨酸富含区域中, C 端 D 结构域形成二硫键连接形成二聚体, N 端的 D 结构域形成二硫键参与的三聚体, 进而形成粘蛋白的分子量较高不溶于水的特点。因此卵鞘的具有良好的保水性能。低密度脂蛋白是一种分泌型糖蛋白, 是 Lipocalin 家族的成员,

在结合和运输特定的疏水分子方面发挥作用, 能与胆红素结合, 在昆虫中, 与着色及抵抗细菌入侵及对抗其它的胁迫信号 (Guo *et al.*, 2016)。钙调素参与胞吐和胞吞, 卵鞘在发育过程中有新的蛋白的合成; 还有鞘脂蛋白可能在调控卵鞘形成、代谢与转运以及在卵鞘形成装配中发挥着关键作用。这些数据将为阐明蟑螂种群生殖机制和深入实施美洲大蠊生物防治提供了新的策略与理论依据。

参考文献 (References)

- Ali SM, Siddiqui R, Ong SK, *et al.* Identification and characterization of antibacterial compound (s) of cockroaches (*Periplaneta americana*) [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101 (1): 253–286.
- Asano T, Seto Y, Hashimoto K, *et al.* Mini-review an insect-specific system for terrestrialization: Laccase-mediated cuticle formation [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 108: 61–70.
- Avila FW, Sirot LK, Laflamme BA, *et al.* Insect seminal fluid proteins: Identification and function [J]. *Annual Review of Entomology*, 2011, 56 (1): 21–40.
- Bell WJ, Adiyodi KG. The American Cockroach (Springer Science & Business Media) [M]. Holland: Kluwer Academic Publishers, 1982.
- Brunet JBC, Kent PW. Observations on the mechanism of a tanning reaction in *Periplaneta* and *Blatta* [J]. *Proceedings of the Royal Society of London*, 1955, 144 (915): 259–274.
- Barbara S, Abram K, Roth LM. Calcium oxalate in the oothecae of cockroaches [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 1960, 53 (1): 79–86.
- Courrent A, Andre Quenedey, Nalepa CA, *et al.* The fine structure of colleterial glands in two cockroaches and three termites, including a detailed study of *Cryptocercus punctulatus* (Blattaria, Cryptocercidae) and *Mastotermes darwiniensis* (Isoptera, Mastotermitidae) [J]. *Arthropod Structure and Development*, 2008, 37 (1): 55–66.
- Dittmer NT, Suderman RJ, Jiang H, *et al.* Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 34 (1): 29–41.
- Futahashi R, Banno Y, Fujiwara H. Caterpillar color patterns are determined by a two-phase melanin gene pre patterning process: New evidence from tan and laccase2 [J]. *Evolution and Development*, 2010, 12 (2): 157–167.
- Gorman MJ, Dittmer NT, Marshall JL, *et al.* Characterization of the multicopper oxidase gene family in *Anopheles gambiae* [J]. *Insect*

- Biochemistry and Molecular Biology* ,2008 ,38 (9) : 817 – 824.
- Guo Hong , Foncea Rocio , O'Byrne Sheila M , *et al.* Lipocalin 2 , a regulator of retinoid homeostasis and retinoid – mediated thermogenic activation in adipose tissue [J]. *Journal of Biological Chemistry* , 2016 ,291 (21) : 11216 – 11229.
- Lake CR , Mills RR , Koeppel JK. *In vivo* conversion of noradrenalin to 3-hydroxy-4-O-β-D glucosidobenzoic acid by the american cockroach [J]. *Insect Biochemistry* ,1975 ,5 (2) : 223 – 229.
- Maya VJF , Valiente E , O'Callaghan J. Study of ultrastructural details of the ootheca of *Periplaneta americana* (Dictyoptera: Blattidae) using scanning electron microscopy [J]. *Interciencia* , 2002 , 27 (5) : 243 – 246.
- Pau RN , Acheson RM. The identification of 3-hydroxy-4-O-beta-D-glucosidobenzyl alcohol in the left colleterial gland of *Blaberus discoidalis* [J]. *Biochim Biophys Acta* , 1968 , 158 (2) : 206 – 211.
- Pryor MGM , Russell PB , Todd AR. Protocatechuic acid , the substance responsible for the hardening of the cockroach oothecal [J]. *Biochemical Journal* ,1946 ,40 (5 – 6) : 627 – 628.
- Sugumaran M , Nellaippan K. On the latency and nature of phenoloxidase present in the left colleterial gland of the cockroach *Periplaneta americana* [J]. *Archives of Insect Biochemistry & Physiology* ,1990 ,15 (3) : 165 – 181.
- Willis JH , Brunet P CJ. The hormonal control of colleterial gland secretion [J]. *Journal of Experimental Biology* ,1966 ,44 (2) : 363 – 378.
- Whitehead DL. New evidence for the control mechanism of sclerotization in insects [J]. *Nature* ,1969 ,224 (5220) : 721 – 723.
- Whitehead DL. Haemocytes play a commensal role in the synthesis of the dihydroxybenzoate required as a precursor for sclerotization of the egg case (ootheca) in the cockroach *Periplaneta americana* (L.) [J]. *Bulletin of Entomological Research* , 2011 , 101 (3) : 251 – 258.
- Whitehead DL , Brunet PCJ , Kent PW. Specificity *in vitro* of a phenoloxidase system from *Periplaneta americana* (L.) [J]. *Nature* ,1960 ,185 (4713) : 610 – 610.
- Wu X , Zhan X , Gan M , *et al.* Laccase2 is required for sclerotization and pigmentation of *Aedes albopictus* eggshell [J]. *Parasitology Research* ,2013 ,112 (5) : 1929 – 1934.