

引文格式: 桂华敏, 鲁武锋, 李丽芳, 等. 基于 iTRAQ 技术分析镉胁迫下泽兰实蝇雄性附腺差异蛋白的表达[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2022, 37(2): 228–236. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202105040](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202105040)

基于 iTRAQ 技术分析镉胁迫下泽兰实蝇 雄性附腺差异蛋白的表达*

桂华敏, 鲁武锋, 李丽芳, 高 平, 吴国星, 高 熹**
(云南农业大学 植物保护学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 【目的】明确镉污染对泽兰实蝇 (*Procecidochares utilis* Stone) 雄性附腺蛋白质造成的影响。【方法】利用同位素标记相对和绝对定量 (isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ) 技术结合 MS/MS 对染镉与未染镉的泽兰实蝇雄性附腺蛋白质进行分析与鉴定。【结果】共鉴定出 3 661 个蛋白质, 具有定量信息差异的蛋白质 58 个, 其中上调的蛋白质 38 个, 下调的蛋白质 20 个。GO 和 KEGG 注释分析和富集分析结果显示: 这些蛋白质具有催化、代谢和转运等功能, 表明染镉后泽兰实蝇雄性附腺中多种功能的蛋白质发生了变化。【结论】本研究明确了镉污染可改变泽兰实蝇雄性附腺蛋白质组, 并鉴定了镉胁迫后泽兰实蝇雄性附腺的差异蛋白。

关键词: 泽兰实蝇; 雄性附腺; 镉; 同位素标记相对和绝对定量 (iTRAQ) 技术; 蛋白质组

中图分类号: Q969.456.803

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2022) 02-0228-09

Differential Proteomic Analysis of the Male Accessory Gland of *Procecidochares utilis* Stone under Cadmium Stress Based on iTRAQ Technique

GUI Huamin, LU Wufeng, LI Lifang, GAO Ping, WU Guoxing, GAO Xi
(College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] To clarify the effects of cadmium pollution on the proteome of the male accessory gland of *Procecidochares utilis* Stone. [Method] Isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ) technique and MS/MS were used to analyze and identify the proteome of the male accessory gland of *P. utilis* with and without cadmium. [Results] A total of 3 661 proteins were identified, of which 58 had quantitative information differences, 38 were up-regulated and 20 were down-regulated. GO and KEGG annotation analysis and enrichment analysis were carried out on the identified differential proteins, and it was found that these proteins had catalytic, metabolic and transport functions. The results showed that the functional proteins in the male accessory glands of *P. utilis* were changed after cadmium-stained. [Conclusion] This study clarified the changes in the

收稿日期: 2021-05-18

修回日期: 2022-01-19

网络首发日期: 2022-03-18

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (31501706, 31460491)。

作者简介: 桂华敏 (1997—), 女, 云南临沧人, 在读硕士研究生, 主要从事害虫综合治理研究。

E-mail: 142354854@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 高熹 (1980—), 女, 福建福州人, 博士, 副教授, 主要从事害虫综合治理研究。E-mail: 12186332@qq.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.s.20220315.1652.002.html>



proteome of the male accessory glands of *P. utilis* caused by cadmium pollution, and identified the differential proteins of the male appendages of *P. utilis* after cadmium stress.

Keywords: *Procecidochares utilis* Stone; male accessory gland; cadmium; iTRAQ technique; proteome

紫茎泽兰 (*Ageratina adenophora* Spreng.) 是泽兰属多年生草本或亚灌木植物, 是一种入侵性杂草, 分布于中国多个省区^[1]。泽兰实蝇 (*Procecidochares utilis* Stone) 属双翅目 (Diptera) 实蝇科 (Tephritidae), 是恶性杂草紫茎泽兰的重要专食性天敌, 在紫茎泽兰防治中起着重要作用。雌性泽兰实蝇把卵产在寄主紫茎泽兰的生长点上, 通过幼虫产生的虫瘿来控制紫茎泽兰开花、结实及扩散^[2-5]。泽兰实蝇可有效控制紫茎泽兰的生长及发育, 并能抑制其光合作用及生物量的增加和分配^[6-9], 通过影响其生理作用从而有效抑制其蔓延危害。

随着经济快速发展, 环境中的重金属镉污染越来越严重, 如今镉已成为中国污染面积最大的重金属^[10]。相关研究表明: 泽兰实蝇对紫茎泽兰的寄生率与离矿中心距离成反比, 说明在镉污染区范围内, 泽兰实蝇对紫茎泽兰的防控作用低。昆虫的雄性附腺能产生生殖因子, 具有交配效应功能。染镉的泽兰实蝇交配后, 出现寿命短、交配能力下降和含卵量低等问题, 且雌虫与染镉的雄虫交配后出现再次交配率显著上升的情况, 表明重金属镉抑制和干扰泽兰实蝇的交配效应^[11]。此外, 镉胁迫对泽兰实蝇雄性附腺的长度和宽度均有显著影响, 对雄性附腺基因的表达也有影响^[11]。在生物体内, 不同蛋白质相互协调行使其生物学行为, 通过 Pathway 分析的显著性富集能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; 利用 WEGO 软件对差异蛋白的主要功能类别进行 GO 注释分析, 可确定差异蛋白行使的主要生物学功能。因此, 本研究以泽兰实蝇雄性附腺蛋白质为研究对象, 利用 iTRAQ 技术分离并鉴定受镉胁迫后差异表达的泽兰实蝇雄性附腺蛋白质, 分析其对重金属镉的响应机制, 为探究重金属镉对泽兰实蝇雄性附腺的毒性效应及其分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 泽兰实蝇种群的建立

在塑料大棚内大批量种植紫茎泽兰以建立泽兰实蝇种群, 以扦插的方式将未经重金属污染的野生紫茎泽兰扦插, 种植在养虫笼内。待紫茎泽兰成活后接入野生泽兰实蝇成虫, 以便让其在紫茎泽兰上产卵。

1.1.2 样品制备

将实验室中的泽兰实蝇分为对照组 (CK) 和重金属镉处理组 (100 mg/kg)^[11]。镉处理组每个月向紫茎泽兰浇灌 1 次重金属镉, 以清水作为对照, 浇水时一次浇透, 浇到盆底漏水为止。当重金属镉初次浇灌 1 周后, 陆续不间断放入已交配但未经镉污染的雌性泽兰实蝇, 用于产卵。卵孵化成幼虫后寄生于紫茎泽兰, 将形成透明窗口的虫瘿剪下并放入扎好透气孔的广口瓶内; 将广口瓶置于温度 24~26 ℃、湿度 70% 的恒温恒压光照培养箱内, 随时观察泽兰实蝇的羽化情况并做好标记^[11]。

1.1.3 雄性附腺蛋白质的提取

当有成虫羽化时, 分别收集当天交配过的染镉和未染镉的泽兰实蝇雄虫置于 PBS 中解剖得到雄性附腺, 每组解剖 300 头。

1.2 试验方法

1.2.1 蛋白提取和样品处理

每个样品取适量进行提取试验。向样品中加入蛋白裂解液 [7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% 十二烷基苯磺酸钠 (SDS)、40 mmol/L Tris-HCl、pH 为 8.5 的 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 和 2 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA)], 混匀后冰上孵育 5 min, 加入终浓度为 10 mmol/L 的二硫苏糖醇 (DTT), 冰浴超声 15 min, 然后 13 000 r/min、4 ℃ 离心 20 min, 取上清装入新的离心管中; 向离心管中加入 4 倍体积的冷丙酮, 在 -20 ℃ 静置过夜。离心收集蛋白沉淀, 空气中晾干。加入

8 mmol/L 尿素和 100 mmol/L TEAB (pH 8.0) 溶液重新溶解蛋白, 加入 DTT 至终浓度为 10 mmol/L, 56 ℃ 水浴 30 min 进行还原反应; 加入碘乙酰胺 (IAM) 至终浓度为 55 mmol/L, 暗处室温放置 30 min 进行烷基化反应。用 Bradford 法测定可溶性蛋白浓度^[12]。

1.2.2 iTRAQ 标记、HPLC 分离及质谱鉴定

将蛋白样品进行酶解处理, 酶解的肽段用同位素标记相对和绝对定量技术 (iTRAQ) 标记; 运用 Ultimate 3000 HPLC 系统 (Thermo DINOEX, USA) 对肽段样品进行分级分离, 色谱柱为 Durashell C18 柱 (5 μ m, 100 Å, 4.6 mm×250 mm); 使用 TripleTOF 5600+液质联用系统 (SCIEX, USA) 对分离的肽段进行质谱检测, 用 Proteomic-sTools 软件^[13]将格式转换成“.mgf”后进行 Mascot 查库鉴定。肽段所代表的蛋白量依据其标记后的同位素标签进行定量, 统计处理组和对照组样品的蛋白量, 最终获得差异表达的蛋白。

1.2.3 蛋白质鉴定及生物信息学分析

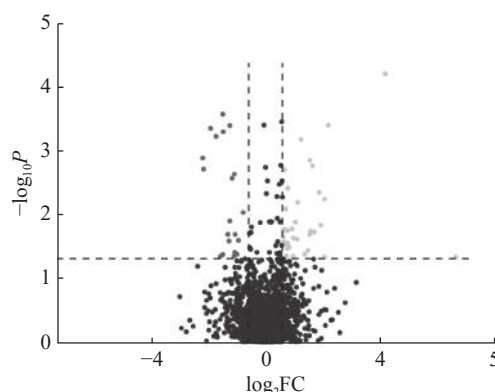
质谱数据使用 ProteinPilot™ V4.5 (AB Sciex 5600 plus) 数据库搜索^[14]。对 ProteinPilot 的鉴定结果进一步过滤, 若 unused score ≥ 1.3 (即可信度水平在 95% 以上), 即可认为至少包含 1 个 unique 肽段的蛋白为可信蛋白。利用重复样品间两两比值的均值经过中位数归一化后作为待比较样品的差异倍数; 利用重复样品间两两比较单样本 Student's *t* 检验 *P* 值的最小值作为待比较样品间的显著性差异检验 *P* 值; 根据差异倍数和 *P* 值筛选差异蛋白。当差异倍数达到 1.5 倍及以上 (即 up_regulate ≥ 1.5 和 down_regulate ≤ 0.67) 且经过显著性统计检验其 *P* ≤ 0.05 时, 视为显著差异蛋白。利用 WEGO 软件对鉴定出差异蛋白的主要功能类别进行 GO 注释分析, 通过 Pathway 分析确定蛋白质参与的最主要途径; 为充分挖掘定量数据包含的生物信息学信息, 将鉴定出的差异蛋白进行 GO 和 KEGG 数据库比对。

2 结果与分析

2.1 泽兰实蝇雄性附腺总蛋白及差异蛋白的鉴定

脱盐后的泽兰实蝇雄性附腺样品经质谱分析及 Mascot 查库, 共鉴定到 3661 个蛋白, 最终有统计学意义的差异蛋白质共 58 个 (*P* < 0.05), 表达

上调的蛋白 38 个, 表达下调的蛋白 20 个 (图 1)。在这些差异表达的蛋白中, 表达量上调和下调倍数前 10 的蛋白见表 1。



注: 黑点表示总定量蛋白, 分布在两侧的浅灰/深灰色点分别代表显著性上/下调差异的蛋白; *P* 值, 差异显著性; FC: 差异倍数。

Note: Black dots indicate total quantitative protein, light gray and dark gray dots represent significant up and down regulated differential proteins, respectively; *P*: *P*-value, which means significant difference; FC: fold change.

图 1 染镉和未染镉组中差异蛋白占总定量蛋白比例的火山分布图

Fig. 1 Volcano distribution map of the proportion of different proteins account for total quantitative proteins

2.2 差异蛋白的 GO 注释

由图 2 可知: 染镉诱导后的差异蛋白在生物学途径中主要参与细胞过程和代谢途径。从细胞组分中可看出: 染镉诱导后产生变化的差异蛋白功能主要为细胞、细胞器部分、细胞器和大分子复合体; 而在差异蛋白的分子功能注释中可看出: 染镉诱导后产生变化的差异蛋白主要功能为催化活性、结合、结构分子活性和分子转换活性, 其中以结合和催化类蛋白最多, 分别占功能差异蛋白的 48.27% 和 46.55%。

2.3 差异蛋白的 Pathway 代谢通路注释

由图 3 可知: 排名前 10 的 Pathway 代谢功能类型在所有上调和下调差异蛋白质中有所不同。排名前 3 的上调差异蛋白 Pathway 功能为代谢途径、微生物在不同环境中的代谢和核糖体, 排名前 3 的下调差异蛋白 Pathway 功能为代谢途径、溶酶体和致病性大肠杆菌感染; 且与下调差异蛋白注释结果相比, 代谢途径在上调差异蛋白质功能注释结果中的比例明显上升。

2.4 差异蛋白的富集分析

2.4.1 差异蛋白的 GO 富集分析

由图 4 可知: 差异表达的蛋白在生物学过程

表 1 泽兰实蝇雄性附腺镉诱导组与对照组排列前 10 的差异蛋白

Tab. 1 The top ten differences in protein analysis on the male accessory gland in <i>Procecidochares utilis</i> with cadmium induced and control group						
蛋白质名称 protein name	分子量/u molecular weight	序列覆盖度情况 (95%可信度) sequence coverage (95% confidence level)	总 unique 肽段数 unique peptides	差异状态 difference status	上调/下调表达量 up-regulated/down- regulated expression	P值 P-value
丙酮酸羧化酶 pyruvate carboxylase	132855.6	50.33	52	上调 up	1.706	0.004
嘌呤霉素敏感氨肽酶 puromycin-sensitive aminopeptidase	115245.3	41.07	44	上调 up	1.585	0.017
过氧化氢酶 catalase	62184.9	64.18	34	上调 up	1.514	0.049
Rab GDP解离抑制剂α Rab GDP dissociation inhibitor alpha	50728.5	449.00	34	上调 up	3.802	0.015
胞质附子水合酶 cytoplasmic aconitate hydratase	99134.6	50.44	33	上调 up	2.355	0.001
白三烯A-4水解酶亚型 X1 leukotriene A-4 hydrolase isoform X1	73814.9	45.09	28	上调 up	4.571	0
柠檬酸合酶 citrate synthase	123257.2	35.41	28	上调 up	1.556	0.018
博来霉素水解酶 bleomycin hydrolase	54534.2	57.65	28	上调 up	2.911	0.001
lon 蛋白酶同源物, 线粒体 lon protease homolog, mitochondria	111691.8	30.15	27	上调 up	2.168	0.001
中性α-葡萄糖苷酶AB neutral alpha-glucosidase AB	108108.5	42.98	23	上调 up	1.600	0.029
蛋白质二硫化物异构酶 protein disulfide-isomerase	45533.1	79.85	43	下调 down	0.470	0.002
可降解的异柠檬酸脱氢酶 probable isocitrate dehydrogenase	43311.5	47.21	17	下调 down	0.581	0.009
脂肪酸合酶 fatty acid synthase	269885.1	8.34	15	下调 down	0.356	0
谷胱甘肽S-转移酶1样 glutathione S-transferase 1-like	27901.0	56.33	14	下调 down	0.445	0.003
角蛋白, I型细胞骨架 keratin, type I cytoskeletal	54306.7	27.13	13	下调 down	0.265	0
角蛋白, II型细胞骨架 keratin, type II cytoskeletal	54999.9	21.58	13	下调 down	0.360	0.001
预测: ATP合酶亚基d predicted: ATP synthase subunit d	20086.4	64.57	12	下调 down	0.421	0
角蛋白, I型细胞骨架17样 keratin, type I cytoskeletal 17-like	52886.6	33.33	10	下调 down	0.302	0.001
脂肪体蛋白1 fat-body protein 1-like	76722.4	15.10	8	下调 down	0.219	0.001
角蛋白, II型细胞骨架5 keratin, type II cytoskeletal 5	64637.6	28.94	7	下调 down	0.421	0.013

中主要富集于分解代谢过程、有机酸代谢过程、羧酸代谢过程和酮酸代谢过程等, 在分子功能方面主要集中富集于金属离子结合、离子结合和阳离子结合过程, 在细胞组分中主要富集于细胞内部分和细胞质。

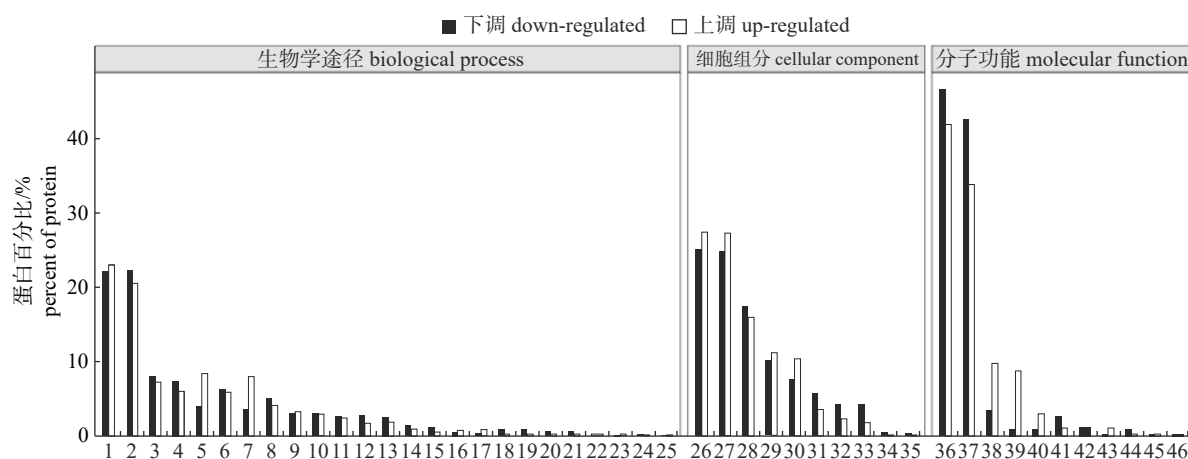
2.4.2 差异蛋白的 KEGG 富集分析

由图 5 可知: 差异蛋白主要参与的途径包括代谢途径、微生物在不同环境中的代谢、酪氨酸代谢和核糖体, 说明这些途径在镉胁迫泽兰实蝇中起重要作用。其中, 上调的差异蛋白 18 个, 包括过氧化氢酶、酚氧化酶和胞质附子水合酶

等; 下调的差异蛋白 5 个, 包括谷胱甘肽 S-转移酶、脂肪酸合酶和 β-半乳糖苷酶等 (表 2)。

3 讨论

环境中的重金属主要通过昆虫的呼吸和取食及外表皮渗透等物理作用直接进入昆虫体内; 也能通过改变植物化学物质成分间接影响昆虫生物习性和昆虫种群增长^[15-18]。如在重金属镉的胁迫下, 能引起白纹伊蚊幼虫、甜菜夜蛾和斜纹夜蛾等昆虫生理生化的一系列改变^[19-21]。实验室前期研究发现: 经试验处理的 Cd²⁺、Pb²⁺或 Zn²⁺均可



注: 1. 细胞过程; 2. 代谢过程; 3. 生物调节; 4. 生物过程调节; 5. 本土化; 6. 细胞成分组织或生物发生; 7. 建立本地化; 8. 刺激反应; 9. 发展过程; 10. 多细胞生物过程; 11. 信号; 12. 生物过程正调控; 13. 生物过程负调控; 14. 免疫系统过程; 15. 死亡; 16. 细胞增殖; 17. 生物黏附; 18. 运动; 19. 病毒繁殖; 20. 再生产; 21. 繁殖过程; 22. 生长; 23. 色素沉着; 24. 有节奏过程; 25. 多生物过程; 26. 细胞; 27. 细胞组分; 28. 细胞器; 29. 细胞器部分; 30. 大分子复合体; 31. 膜封闭腔; 32. 胞外区; 33. 胞外区部分; 34. 突触; 35. 突触部分; 36. 连接; 37. 催化活性; 38. 转运活性; 39. 结构分子活性; 40. 电子载体活性; 41. 酶调节活性; 42. 蛋白质结合转录活性; 43. 分子转导活性; 44. 抗氧化活性; 45. 核酸结合转录因子活性; 46. 翻译调节活性。

Note: 1. cellular process; 2. metabolic process; 3. biological regulation; 4. regulation of biological process; 5. localization; 6. cellular component organization or biogenesis; 7. establishment of localization; 8. response to stimulus; 9. developmental process; 10. multicellular organismal process; 11. signaling; 12. positive regulation of biological process; 13. negative regulation of biological process; 14. immune system process; 15. death; 16. cell proliferation; 17. biological adhesion; 18. locomotion; 19. viral reproduction; 20. reproduction; 21. reproductive process; 22. growth; 23. pigmentation; 24. rhythmic process; 25. multi-organism process; 26. cell; 27. cell part; 28. organelle; 29. organelle part; 30. macromolecular complex; 31. membrane-enclosed lumen; 32. extracellular region; 33. extracellular region part; 34. synapse; 35. synapse part; 36. binding; 37. catalytic activity; 38. transporter activity; 39. structural molecule activity; 40. electron carrier activity; 41. enzyme regulation activity; 42. protein binding transcription activity; 43. transcription activity; 44. antioxidant activity; 45. nucleic acid binding transcription factor activity; 46. translation regulation activity.

图 2 差异蛋白的 GO 注释

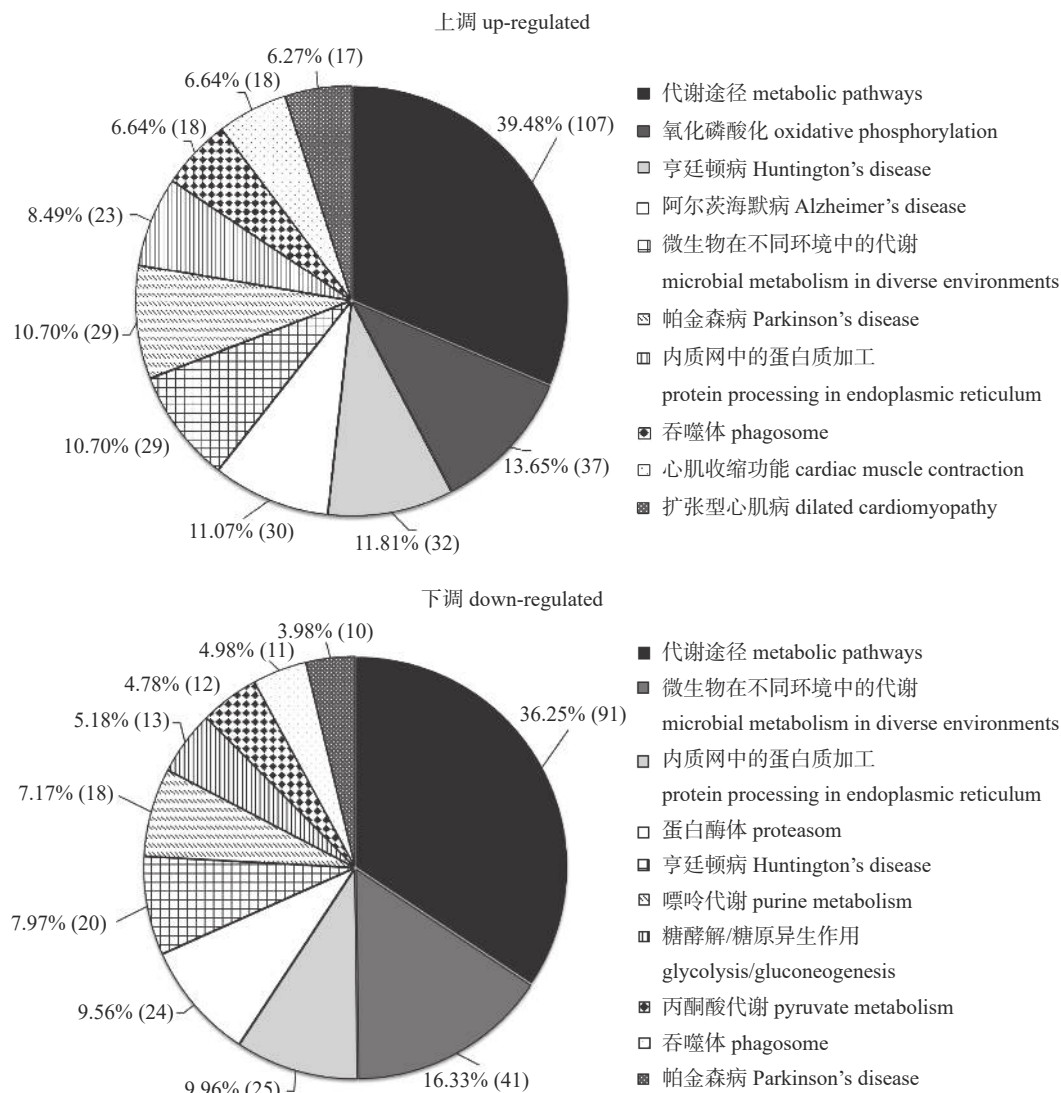
Fig. 2 GO functional annotation for differential protein

通过紫茎泽兰传递并累积到泽兰实蝇老熟幼虫体内, 引起老熟幼虫一系列生理变化^[22]。镉胁迫后, 泽兰实蝇雄性附腺的长度和宽度均发生明显变化, 且不同浓度镉胁迫下泽兰实蝇雄性附腺发生不同程度的变化, 镉胁迫同样对雄性附腺基因的表达产生影响, 造成 150 条基因差异表达^[11]。基因水平上的差异最终将反映在蛋白质水平上, 所以本研究利用 iTRAQ 技术分析镉胁迫下泽兰实蝇雄性附腺差异蛋白的表达。

本研究共鉴定出 3661 个蛋白, 具有定量信息差异的蛋白 58 个, 其中上调的蛋白 38 个, 下调的蛋白 20 个。在这些差异表达的蛋白中, 唯一肽段最多的上调蛋白有: 丙酮酸羧化酶、嘌呤霉素敏感氨肽酶、过氧化氢酶 (CAT) 和 Rab GDP 解离抑制剂 α 等。其中, 限速酶丙酮酸羧化酶存在于线粒体中, 催化不可逆的反应; 嘌呤霉素敏感的氨肽酶是一种大脑分泌的酶; CAT 是一类广泛存在于动物、植物和微生物体内的末端氧化酶, 是生物防御系统的关键酶之一, 它能催化细胞内过氧化氢分解, 防止过氧化; 也有研究表

明: CAT 能将蚕在代谢过程中产生的有毒过氧化氢分解成水和分子氧从而达到解毒作用^[23-24]; Rab GDP 解离抑制剂 α 是涉及神经传导的 Rab 小 G 蛋白的调节因子^[25]。在差异表达的蛋白中, 下调蛋白有蛋白质二硫键异构酶 (PDI)、可溶性异柠檬酸脱氢酶 (IDH)、脂肪酸合酶和谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 等。其中, PDI 是 1 个多功能的应激蛋白, 对病毒和细菌的侵染具有防御作用; IDH 是三羧酸循环的关键酶, 在三羧酸循环和乙醛酸旁路的碳通量分配中起关键的调控作用; 脂肪酸合酶是脂肪酸合成的关键限速酶, 可影响机体内脂肪组织的合成代谢和分解代谢^[26]; GSTs 是昆虫中常见的多功能氧化酶系, 在昆虫对外源物质解毒代谢过程中发生作用^[27]。当生物体处于逆境时, GST 常发挥二相代谢酶和抗氧化酶的双重功能, 保护生物体免受逆境损害^[28]。

研究发现: GST 在苹果蠹蛾对吡虫啉的解毒代谢中起主导作用^[29]; 不同浓度镉处理后, GST 活性在棕尾别麻蝇幼虫和成虫体内均受到抑制^[30]; 经 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 处理后, 棕尾别麻蝇幼虫体内超氧



注: 百分数字表示排名前 10 的 Pathway 代谢功能类型占上调/下调差异蛋白质功能注释结果中的比例, 括号中数字为每个功能下的蛋白质数量。

Note: Percentage numbers indicate the proportion of the top 10 pathway metabolic function types in the results of up-regulation/down-regulation differential protein function annotations. The indication in parentheses refers to the number of proteins under each function.

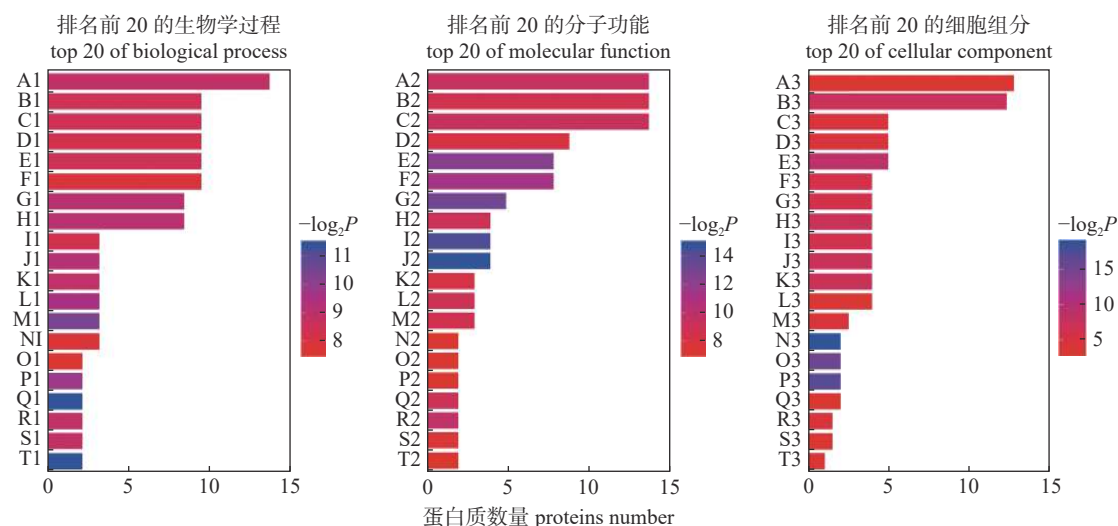
图 3 染镉和未染镉泽兰实蝇雄性附腺中上调/下调差异蛋白质 Pathway 代谢通路

Fig. 3 Pathway of up-regulated/down-regulated proteins in the accessory glands of *P. utilis* with cadmium infected and non cadmium infected

化物歧化酶 (SOD) 和 CAT 活性受抑制, 且抑制程度随处理浓度的升高而加强^[31]。本研究发现: 镉胁迫下 CAT 表达量上调, 这与低浓度 Cd^{2+} 处理下中华稻蝗的 GST 活性被激活^[19]类似, 而重金属对昆虫抗氧化酶系统的影响因昆虫种类和重金属种类而异^[31], 故推测本研究中 CAT 活性升高可能是昆虫为抵御由重金属引起的氧化损伤和增强解毒代谢而做出的应激反应^[32]。镉能在体内富集, 被富集后能显著影响泽兰实蝇的生长发育和化学防御; 此外, 镉会对泽兰实蝇的生殖功能造成一定的损坏, 导致泽兰实蝇生殖力减弱^[11], 低

浓度重金属对泽兰实蝇幼虫的影响小, 高浓度则影响大, 泽兰实蝇幼虫对重金属具有一定的抵御作用^[22], 故推测泽兰实蝇成虫也能利用自身的解毒或避毒机制抵御重金属危害。昆虫可通过抗氧化酶系统清除过量活性氧以减少镉对机体的损害^[33], 除消化道、马氏管、脂肪体和体壁外, 昆虫的生殖腺也具有储存过量重金属的功能^[22], 由此分析泽兰实蝇雄性附腺可通过调控 CAT 和 GST 对重金属进行代谢解毒, 从而延缓并减弱重金属造成的毒性损伤。

本研究对差异蛋白的 GO 显著性分析发现:



注: A1. 分解代谢过程; B1. 含氧酸代谢过程; C1. 有机酸代谢过程; D1. 细胞酮代谢过程; E1. 羧酸代谢过程; F1. 生物聚合物分解代谢过程; G1. 蛋白水解; H1. 蛋白质分解代谢过程; I1. 对氧化应激的反应; J1. 丙酮酸代谢过程; K1. 单糖生物合成过程; L1. 己糖, M1. 糖异生; N1. 酒精生物合成过程; O1. 翻译保真度的调节; P1. 肽分解代谢过程; Q1. 半桥粒组装; R1. 表皮发育; S1. 外胚层发育; T1. 细胞—底物连接组装; A2. 金属离子结合; B2. 离子结合; C2. 阳离子结合; D2. 结构分子活性; E2. 肽酶活性, 作用于 L-氨基酸; F2. 肽酶活性; G2. 外肽酶活性; H2. 金属肽酶活性; I2. 金属外肽酶活性; J2. 氨肽酶活性; K2. rRNA 结合; L2. 受体活性; M2. 分子内氧化还原酶活性; N2. 跨膜受体活性; O2. 丝氨酸水解酶活性; P2. 氨酸型肽酶活性; Q2. 丝氨酸型内肽酶活性; R2. 金属氨肽酶活性; S2. 分子内氧化还原酶活性; T2. 羧肽酶活性; A3. 细胞内部分; B3. 细胞质; C3. 非膜界细胞器; D3. 细胞内非膜界细胞器; E3. 胞外区; F3. 囊泡; G3. 膜结合囊泡; H3. 细胞外囊泡分泌体; I3. 胞外区部分; J3. 细胞外器; K3. 细胞外膜结合的细胞器; L3. 胞质溶胶; M3. 核糖体; N3. 角蛋白丝; O3. 中间丝细胞骨架; P3. 中间丝; Q3. 细胞骨架部分; R3. 胞质核糖体; S3. 胞质部分; T3. 胞质小核糖体亚基。

Note: A1. catabolic process; B1. oxoacid metabolic process; C1. organic acid metabolic process; D1. cellular ketone metabolic process; E1. carboxylic acid metabolic process; F1. biopolymer catabolic process; G1. proteolysis; H1. protein catabolic process; I1. response to oxidative stress; J1. pyruvate metabolic process; K1. monosaccharide biosynthetic process; L1. hexose; M1. gluconeogenesis; N1. alcohol biosynthetic process; O1. regulation of translational fidelity; P1. peptide catabolic process; Q1. hemidesmosome assembly; R1. epidermis development; S1. ectoderm development; T1. cell-substrate junction assembly; A2. metal ion binding; B2. ion binding; C2. cation binding; D2. structural molecule activity; E2. peptidase activity, acting on L-amino acid; F2. peptidase activity; G2. exopeptidase activity; H2. metalloproteinase activity; I2. metallopeptidase activity; J2. aminopeptidase activity; K2. rRNA binding; L2. receptor activity; M2. intramolecular oxidoreductase activity; N2. transmembrane receptor activity; O2. serine hydrolase activity; P2. serine-type peptidase activity; Q2. serine-type endopeptidase activity; R2. metal aminopeptidase activity; S2. intramolecular oxidoreductase activity; T2. carboxypeptidase activity; A3. intracellular part; B3. cytoplasm; C3. non-membrane-bounded organelle; D3. intracellular non-membrane-bounded organelle; E3. extracellular region; F3. vesicle; G3. membrane-bounded vesicle; H3. extracellular vesicular exosome; I3. extracellular region part; J3. extracellular organelle; K3. extracellular membrane-bounded organelle; L3. cytosol; M3. ribosome; N3. keratin filament; O3. intermediate filament cytoskeleton; P3. intermediate filament; Q3. cytoskeletal part; R3. cytosolic ribosome; S3. cytosolic part; T3. cytosolic small ribosomal subunit.

图 4 差异蛋白的 GO 富集分析

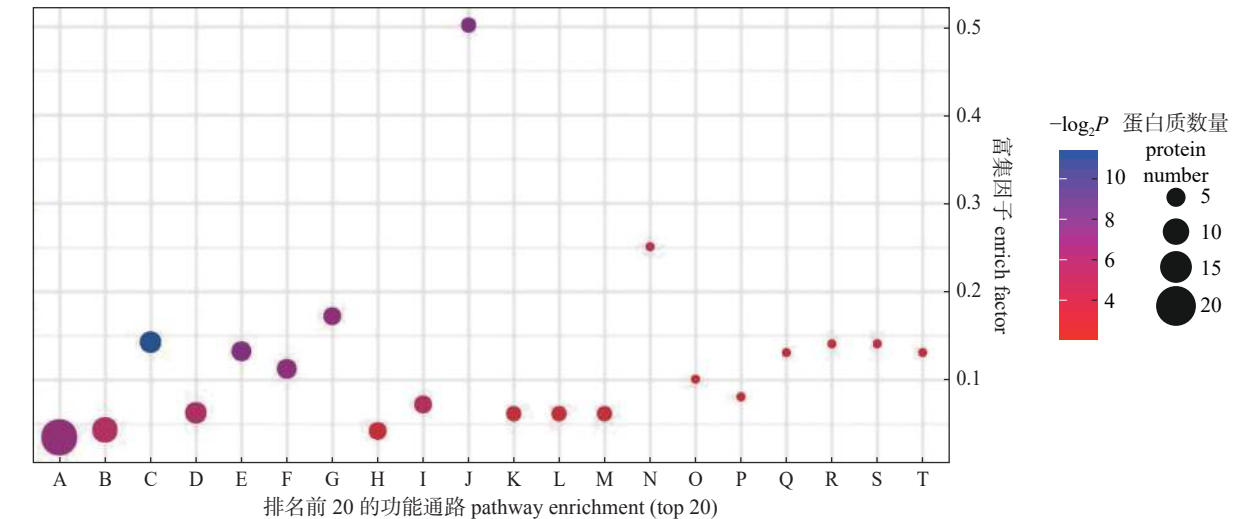
Fig. 4 GO enrichment analysis of different proteins

差异表达的蛋白在生物学过程中主要富集于分解代谢过程、有机酸代谢过程、羧酸代谢过程和酮酸代谢过程, 这些代谢过程在生物学过程中起着关键作用; 在分子功能方面主要集中富集于金属离子结合、离子结合和阳离子结合过程; 在细胞组分中主要富集于细胞内部分和细胞质, 说明差异表达的蛋白主要在细胞内发挥作用。通过 Pathway 显著性富集确定差异蛋白主要参与的途径有代谢途径、微生物在不同环境中的代谢、酪氨酸代谢和核糖体, 说明这些途径在镉胁迫泽兰实蝇中起重要作用。在这些代谢途径中, 上调蛋白 18 个, 包括过氧化氢酶、酚氧化酶和胞质附子水合酶等, 其中, 酚氧化酶在昆虫免疫防御以及生理发育过程中起到不可或缺的作用^[34], 胞质附子

水合酶是参与抗氧化反应的硫还原蛋白过氧化物酶; 下调蛋白 5 个, 包括谷胱甘肽 S-转移酶、脂肪酸合酶和 β -半乳糖苷酶等, 其中, 脂肪酸合酶在能量运输和储存、细胞结构和提供激素合成的中间物等多个方面发挥关键作用。

4 结论

本研究明确了镉污染可改变泽兰实蝇雄性附腺的蛋白质组, 鉴定了镉胁迫泽兰实蝇雄性附腺后的差异蛋白, 为进一步揭示重金属胁迫对泽兰实蝇雄性附腺蛋白质组的响应原理及生殖毒性损伤机理奠定了基础, 为今后的基因克隆和功能研究提供了基础数据。



注: A. 代谢途径; B. 不同环境中的微生物代谢; C. 酪氨酸代谢; D. 核糖体; E. 黑色素生成; F. 柠檬酸循环 (TCA 循环); G. 核黄素代谢; H. 溶酶体; I. 谷胱甘肽代谢; J. 金黄色葡萄球菌感染; K. 前列腺癌; L. 细胞色素 P450 对异生素的代谢; M. 药物代谢—细胞色素 P450; N. 牛磺酸和亚牛磺酸代谢; O. 鞘脂代谢; P. 其他聚糖降解; Q. Notch 信号通路; R. 鞘糖脂生物合成—神经节系列; S. 脂肪酸生物合成; T. 花生四烯酸代谢。

Note: A. metabolic pathways; B. microbial metabolism in diverse environments; C. tyrasine metabolism; D. ribosome; E. melanogenesis; F. citrate cycle (TCA cycle); G. riboflavin metabolism; H. lysosome; I. glutathione metabolism; J. *Staphylococcus aureus* infection; K. prostate cancer; L. metabolism of xenobiotics by cytochrome P450; M. P450 drug metabolism-cytochrome P450; N. taurine and hypotaurine metabolism; O. sphingolipid metabolism; P. other glycan degradation; Q. Notch signaling pathway; R. glycosphingolipid biosynthesis-ganglio series; S. fatty acid biosynthesis; T. arachidonic acid metabolism.

图 5 差异蛋白 Pathway 富集分析气泡图

Fig. 5 Differential protein pathway enrichment analysis bubble chart

表 2 参与代谢途径数量最多的差异蛋白

Tab. 2 Differential proteins with the largest number of metabolic pathways

蛋白质序列号 protein ID	蛋白质名称 protein name	差异状态 difference status	通路 pathway
Cluster-14817.42665_orf1	过氧化氢酶 catalase	上调 up	①
Cluster-13214.122055_orf1	酚氧化酶2 phenoloxidase 2	上调 up	②
Cluster-13214.51783_orf1	胞质附子水合酶 cytoplasmic aconitate hydratase	上调 up	①
Cluster-14817.27513_orf1	中性α-葡萄糖苷酶AB neutral α-glucosidase AB	上调 up	③
Cluster-13214.65160_orf1	白三烯A-4水解酶异构体X1 leukotriene A-4 hydrolase isoform X1	上调 up	③
Cluster-13214.67314_orf1	ATP柠檬酸合酶 ATP-citrate synthase	上调 up	①
Cluster-13214.72527_orf1	推测的氨基肽酶W07G4.4 putative aminopeptidase W07G4.4	上调 up	③
Cluster-14817.33501_orf1	葡萄糖-6-磷酸异构酶 glucose-6-phosphate isomerase	上调 up	①
Cluster-14817.17612_orf1	磷酸丙糖异构酶 triosephosphate isomerase	上调 up	①③
Cluster-13214.116940_orf1	芳基贮存蛋白 arylphorin	上调 up	②③
Cluster-13214.105550_orf1	嘧啶二氮平合酶 pyrimidodiazepine synthase	上调 up	①②③
Cluster-13214.69983_orf1	腺苷酸琥珀酸合成酶 adenylosuccinate synthetase	上调 up	③
Cluster-14817.19801_orf1	半胱氨酸亚磺酸脱羧酶 cysteine sulfinic acid decarboxylase	上调 up	③
Cluster-14817.30736_orf1	60S核糖体蛋白L18a 60S ribosomal protein L18a	上调 up	④
Cluster-14817.31467_orf1	GH15146	上调 up	④
Cluster-13214.78471_orf1	40S核糖体蛋白S4 40S ribosomal protein S4	上调 up	④
Cluster-14817.31146_orf1	核糖体蛋白S15Aa ribosomal protein S15Aa	上调 up	④
Cluster-13214.72980_orf1	40S核糖体蛋白S5a 40S ribosomal protein S5a	上调 up	④
Cluster-14817.31541_orf1	谷胱甘肽S-转移酶1样 glutathione S-transferase 1-like	下调 down	②③
Cluster-14817.54636_orf1	脂肪酸合酶 fatty acid synthase	下调 down	③
Cluster-13214.79618_orf1	β-半乳糖苷酶 β-galactosidase	下调 down	③
Cluster-13214.42473_orf1	可降解的异柠檬酸脱氢酶 probable isocitrate dehydrogenase	下调 down	①③
Cluster-13214.113990_orf1	脂肪体蛋白1 fat-body protein 1-like	下调 down	②③

注: ① 微生物在不同环境中的代谢; ② 酪氨酸代谢; ③ 代谢途径; ④ 核糖体。

Note: ① microbial metabolism in diverse environments; ② tyrosine metabolism; ③ metabolic pathways; ④ ribosome.

[参考文献]

- [1] 段惠, 强胜, 吴海荣, 等. 紫茎泽兰(*Eupatorium adenophorum* Spreng)[J]. 杂草科学, 2003(2): 37. DOI: 10.19588/j.issn.1003-935x.2003.02.015.
- [2] 何大禹, 刘伦辉, 荆桂芬, 等. 泽兰实蝇的安全性试验[J]. 生物防治通报, 1987, 3(1): 1. DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.1987.01.001.
- [3] 张智英, 魏艺, 何大愚. 泽兰实蝇生物学特性的初步研究[J]. 生物防治通报, 1988, 4(1): 10. DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.1988.01.004.
- [4] 夏忠敏, 金星, 刘昌权. 紫茎泽兰在贵州的发生危害情况及防除对策[J]. 植保技术与推广, 2002, 22(12): 34. DOI: 10.3969/j.issn.1672-6820.2002.12.015.
- [5] 杨光礼, 孙元体. 泽兰实蝇对紫茎泽兰抑制效果的初步观察[J]. 杂草科学, 1993(2): 15. DOI: 10.19588/j.issn.1003-935x.1993.02.006.
- [6] BESS H A, HARAMOTO F H. Biological control of pamakani, *Eupatorium adenophorum* in Hawaii by a tephritid gall fly, *Procecidochares utilis*. 2. Population studies of the weed, the fly, and the parasites of the fly[J]. Ecology, 1959, 40(2): 244. DOI: 10.2307/1930034.
- [7] BENNETT P H, VAN STAADEN J. Gall formation in crofton weed, *Eupatorium adenophorum* Spreng (syn. *Ageratina adenophora*), by the *Eupatorium* gall fly *Procecidochares utilis* Stone (Diptera: Trypetidae)[J]. Australian Journal of Botany, 1986, 34(4): 473. DOI: 10.1071/bt9860473.
- [8] 陈升碧, 关德盛. 泽兰实蝇生物学特性观察及生物防治[J]. 西南农业学报, 1994, 7(4): 98. DOI: 10.16213/j.cnki.scjas.1994.04.019.
- [9] 李爱芳, 高贤明, 党伟光, 等. 泽兰实蝇寄生状况及其对紫茎泽兰生长与生殖的影响[J]. 植物生态学报, 2006, 30(3): 496. DOI: 10.3321/j.issn:1005-264X.2006.03.017.
- [10] 李兆辉, 王光明, 徐云明, 等. 镉、汞、铅污染及其微生物修复研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(9): 39.
- [11] 鲁武锋. 泽兰实蝇雄性附腺的转录组分析及Cd²⁺对三个敏感基因的表达影响[D]. 昆明: 云南农业大学, 2019.
- [12] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [13] SHENG Q H, DAI J, WU Y B, et al. Build summary: using a group-based approach to improve the sensitivity of peptide/protein identification in shotgun proteomics[J]. Journal of Proteome Research, 2012, 11(3): 1494. DOI: 10.1021/pr200194p.
- [14] KANEHISA M, ARAKI M, GOTO S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36: D480. DOI: 10.1093/nar/gkm882.
- [15] ALSTAD D N, EDMUNDS G F, WEINSTEIN L H. Effects of air pollutants on insect populations[J]. Annual Review of Entomology, 1982, 27(1): 369. DOI: 10.1146/annurev.en.27.010182.002101.
- [16] 吴国星, 叶恭银, 胡萃, 等. 重金属镉对棕尾别麻蝇亲代及子代生长发育与繁殖的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2006, 32(1): 71. DOI: 10.3321/j.issn:1008-9209.2006.01.015.
- [17] SCHEIRS J, VANDEVYVEREE I, WOLLAERT K, et al. Plant-mediated effects of heavy metal pollution on host choice of a grass miner[J]. Environmental Pollution, 2006, 143(1): 138. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.11.001.
- [18] 吴国星, 高熹, 叶恭银, 等. 取食重金属铜对棕尾别麻蝇亲代及子代生长发育与繁殖的影响[J]. 昆虫学报, 2007, 50(10): 1042. DOI: 10.16380/j.kcxb.2007.10.013.
- [19] 李珂清. 重金属镉胁迫对菜心 *Brassica campestris* 和植食性昆虫斜纹夜蛾 *Spodopteralitura* 的影响[D]. 广州: 华南农业大学, 2017.
- [20] 邹金城. 镉(Cd²⁺)胁迫对甜菜夜蛾发育、飞行的影响及其相关生理机制分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2018.
- [21] 俞玲园, 魏莹, 陈旭敏, 等. 重金属镉胁迫对白纹伊蚊幼虫海藻糖代谢的影响[J]. 昆虫学报, 2019, 62(11): 1250. DOI: 10.16380/j.kcxb.2019.11.002.
- [22] 马沙, 兰明先, 鲁武锋, 等. 重金属累积对泽兰实蝇幼虫生长发育和保护酶的影响[J]. 环境昆虫学报, 2018, 40(4): 866. DOI: 10.3969/j.issn.1674-0858.2018.04.18.
- [23] 吴载德. 蚕体解剖生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1989.
- [24] 张坤生, 田荟琳. 过氧化氢酶的功能及研究[J]. 食品科技, 2007, 32(1): 8. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9989.2007.01.003.
- [25] ISHIZAKI H, MIYOSHI J, KAMIYA H, et al. Role of Rab GDP dissociation inhibitor alpha in regulating plasticity of hippocampal neurotransmission[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(21): 11587. DOI: 10.1073/pnas.97.21.11587.
- [26] 雷安平, 陈欢, 黎双飞, 等. 谷胱甘肽S-转移酶的功能、应用及克隆表达[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(12): 85. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6504.2009.12.020.
- [27] 尤燕春, 谢苗, 尤民生. 昆虫谷胱甘肽S-转移酶的多样性及其介导的抗药性[J]. 应用昆虫学报, 2013, 50(3): 831. DOI: 10.7679/j.issn.2095-1353.2013.116.
- [28] 张芮, 陈斯钰. 脂肪酸合成酶(FAS)的研究综述[J]. 农村经济与科技, 2018, 29(13): 103. DOI: 10.3969/j.issn.1007-7103.2018.13.040.
- [29] 刘刚. 谷胱甘肽S-转移酶在苹果蠹蛾对吡虫啉的解毒代谢中起主导作用[J]. 农药市场信息, 2017(9): 55.
- [30] 胡晓宇. 重金属镉胁迫对黑腹果蝇生长发育及防御能力的影响[D]. 西安: 陕西师范大学, 2019.
- [31] 王慧, 吴国星, 叶恭银, 等. 铜和镉在棕尾别麻蝇体内的累积及其对三种抗氧化酶活性的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2006, 32(1): 77. DOI: 10.3321/j.issn:1008-9209.2006.01.016.
- [32] 刘耀明, 杨慧敏, 张育平, 等. 镉和铬急性染毒对中华稻蝗解毒酶及多酚氧化酶的影响[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(7): 1321. DOI: 10.11654/jaes.2013.07.006.
- [33] 孙虹霞, 刘颖, 张古忍. 重金属污染对昆虫生长发育的影响[J]. 昆虫学报, 2007, 50(2): 178. DOI: 10.16380/j.kcxb.2007.02.012.
- [34] 徐亚玲, 李文楚. 昆虫酚氧化酶作用机制的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(27): 14844. DOI: 10.13989/j.cnki.0517-6611.2010.27.046.

责任编辑: 何馨成