

热激对家蚕后部丝腺磷酸化蛋白质组的影响

夏爱华<sup>1,2</sup>,李季生<sup>1,2,3\*</sup>,李娜<sup>1,2</sup>,贾漫丽<sup>1,2</sup>,王晖<sup>1,2</sup>,杨贵明<sup>1,2</sup>

(1. 河北省高校特产蚕桑应用技术研发中心,河北 承德 067000; 2. 承德医学院 蚕业研究所,河北 承德 067000; 3. 浙江大学 动物科学学院,浙江 杭州 310029)

**摘要:** 为了探索蛋白质磷酸化在高温环境胁迫中发挥的作用,以秋丰×白玉家蚕为试验材料,将5龄第3天的家蚕放置在40℃培养箱内热激10 min,以未热激的家蚕为对照,利用双向电泳和质谱技术对后部丝腺磷酸化蛋白进行了分析和鉴定。结果发现,与对照相比,9个磷酸化蛋白在短期的热激之后表达量下降,包括腺苷酸激酶,延伸因子EF-1δ、EF-1β',核糖体蛋白P0、P1、P2以及轻链丝心蛋白等。GO分析表明,这些蛋白质主要参与能量代谢和丝心蛋白合成。对以上磷酸化蛋白的结构和功能进行分析,并利用NetPhos工具进行磷酸化位点预测,结果表明,这些蛋白质二级结构主要以α螺旋或无规则卷曲为主,无跨膜结构域,均存在磷酸化修饰。

**关键词:** 热激; 家蚕; 后部丝腺; 磷酸化蛋白; 双向电泳; 质谱; 生物信息学

**中图分类号:** S885      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2016)02-0127-08

Effect of Heat Shock on Phosphorylation Proteins of  
Silkworm Posterior Silk Gland

XIA Aihua<sup>1,2</sup>, LI Jisheng<sup>1,2,3\*</sup>, LI Na<sup>1,2</sup>, JIA Manli<sup>1,2</sup>, WANG Hui<sup>1,2</sup>, YANG Guiming<sup>1,2</sup>

(1. Hebei Universities R&D Centre for Sericulture and Specialty Enabling Technologies, Chengde 067000, China;  
2. Institute of Sericulture, Chengde Medical University, Chengde 067000, China;  
3. College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** In order to preliminarily explore the function of protein phosphorylation under environmental stress from the molecular level, silkworm strain Qiufeng × Baiyu of 5th instar 3rd day were placed into incubator at 40℃ for 10 min. We analyzed and identified the differentially expressed phosphorylation proteins of silkworm utilizing two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. Results showed that nine protein spots related to silk synthesis, including adenosine kinase, elongation factor 1 delta, elongation factor 1 beta', ribosomal protein P0, ribosomal protein P1, ribosomal protein P2 and fibroin L-chain, etc., showed down-regulated trends after heat shock. Functional analysis revealed that these proteins were involved in energy metabolism and fibroin synthesis. In addition, we further analyzed the structure and function of these phosphorylated proteins, and employed the NetPhos to predict their phosphorylation sites. Results showed that these proteins took alpha helix or random curl as their main secondary structure form, and did not possess transmembrane domain. Moreover, phosphorylated modification was found in all proteins.

**Key words:** heat shock; silkworm; posterior silk gland; phosphorylation proteins; two-dimensional electrophoresis; mass spectrometry; bioinformatics

收稿日期:2015-08-22  
基金项目:河北省教育厅资助项目(Q2012026);承德医学院校级课题(201538)  
作者简介:夏爱华(1979-),女,山东青州人,助理研究员,硕士,主要从事家蚕遗传学和生物技术方面的研究。  
E-mail:aihuaxia2008@163.com  
\* 通讯作者:李季生(1978-),男,山东泰安人,助理研究员,博士,主要从事蚕桑分子生物学方面的研究工作。  
E-mail:jshlee@163.com  
网络出版时间:2016-02-02 17:40:12  
网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/41.1092.S.20160202.1740.002.html>

家蚕是重要的经济昆虫,在许多国家其已经成为蚕农的主要生活来源,除了具有经济价值,家蚕作为鳞翅目昆虫的代表还是研究昆虫生理学、生物学和遗传学著名的模式生物<sup>[1]</sup>。丝腺是家蚕最重要的器官之一,在丝蛋白分泌、合成等一系列生命活动中发挥重要的作用。根据解剖结构和生理功能的不同,一般将其划分为 3 个重要的组成部分,即前部丝腺、中部丝腺和后部丝腺。前部丝腺无分泌功能,中部丝腺负责合成丝胶蛋白类物质,后部丝腺是丝腺中最长的部分,它主要承担着丝心蛋白合成的功能。丝心蛋白主要由丝素重链、丝素轻链、P25 蛋白以 6:6:1 比例组成<sup>[2]</sup>。尤其到了 5 龄期,家蚕的丝腺细胞急剧膨大,大量合成丝蛋白。5 龄第 3 天通常被看作是家蚕后部丝腺发育的里程碑。从性状来看,5 龄第 2 天之后家蚕食桑量显著提高,丝腺细胞快速生长<sup>[3]</sup>。从基因表达谱来看,5 龄第 3 天和第 5 天率先聚类到一起,表达模式与 5 龄第 1 天和 4 龄眠蚕有一定差异,而且从蚕丝蛋白基因表达上也能明显看到这一点<sup>[4]</sup>。因此,研究 5 龄家蚕后部丝腺对揭示丝蛋白基因表达、转录后调控及茧丝高产机制等具有至关重要的作用。

温度是养蚕过程中最值得关注的因素,高温可导致家蚕正常的生理代谢出现故障,从而引发多种疾病,导致蚕茧质量和产量下降<sup>[5-8]</sup>。然而,在一些热带地区或国家,夏季室内的温度常常能达到 40℃ 以上。因此,探索极端高温天气对生物的影响,以及如何提高生物的抗逆性等,这些问题一直是学者们关注的热点<sup>[9]</sup>。近年来,人们利用蛋白质组学技术研究高温条件对水稻<sup>[10]</sup>、大豆<sup>[11]</sup>、马齿苋<sup>[12]</sup>产量和生长的影响,揭示了一些功能蛋白在高温胁迫条件下参与的积极作用。家蚕是模式昆虫中不可多得的材料,而蚕体也是个微妙的系统。因此,从分子水平探索高温胁迫对家蚕蛋白质组学的影响,可为今后的分子育种提供参考。

蛋白质的磷酸化修饰是一种广泛存在于生物体内各种组织细胞中的蛋白质翻译后修饰方式,机体大约 30% 的蛋白质均可发生不同形式的磷酸化<sup>[13]</sup>,其磷酸化位点主要发生于酪氨酸、丝氨酸与苏氨酸残基<sup>[14]</sup>。蛋白质磷酸化在一些模式生物上的研究是一个热点,但在家蚕中的相关研究还处在初级阶段。

综上所述,利用磷酸化蛋白质组学探索家蚕分子水平上的热激应答,不仅对于挖掘抗性蛋白质或基因用于家蚕抗性分子育种具有潜在价值,而且对于深入

探索磷酸化蛋白在逆境胁迫中发挥的作用和分子机制也具有重要的意义。为此,通过高温胁迫家蚕,利用双向电泳、Pro-Q Diamond 荧光检测法以及基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱来研究家蚕后部丝腺蛋白质组的磷酸化现象,分析其磷酸化差异蛋白的表达变化,旨在探讨磷酸化蛋白在环境胁迫中发挥的作用,为今后的家蚕分子育种提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的家蚕品种为适宜夏秋期饲养的单限性品种秋丰×白玉(QB),由浙江大学动物科学学院蚕桑馆提供。本研究采用新鲜桑叶,在 25℃ 条件下按每天早、中、晚 3 次饲育方式养殖家蚕。饲喂至 5 龄第 3 天,选取大小、龄期基本一致的家蚕 60 头,雌雄各半,随机分为 2 组,即热激组和对照组。热激组在 40℃ 的条件下进行 10 min 的热激处理,之后,热激组组和对照组均在 4℃、0.7% 的氯化钠溶液中解剖经过液氮冷冻的家蚕后部丝腺。洗净后置于 70% 乙醇中浸泡 10 min,在显微镜下剥取丝腺组织,装入 1.5 mL 离心管中,−20℃ 保存备用。

1.2 蛋白质制备

称取一定量的家蚕后部丝腺组织,放在冰上使其缓慢溶解,然后按 1 mg 丝腺细胞加 10 μL 磷酸缓冲液抽提液,分次加入样品裂解缓冲液,冰上研磨。每研磨 1 min 低速离心 10 s,共研磨 10 min,然后室温放置 10 min。超声波处理 30 s,然后冰上放置 30 s,重复 4 次。25℃ 下 15 000 r/min 离心 10 min,取上清,重复 2 次,取上清液分装。蛋白质定量方法采用 Bradford 法<sup>[15]</sup>,在 595 nm 处测定标准蛋白和样品蛋白的吸光度,并采用标准曲线法计算样品蛋白的浓度。最后,根据所需蛋白质量分装至离心管中,−20℃ 下保存备用。

1.3 双向电泳及染色

双向电泳参考 Zhou 等<sup>[16]</sup>的方法,采用 Ettan IPGphor3 等电聚焦和 SDS-PAGE 垂直电泳系统 Ettan Dalt six (Amersham Biosciences)。胶条采用 pH 值为 3~10 的 24 cm 线性干胶条。双向电泳完成后,小心取出凝胶,清洗后进行硝酸银和 Pro-Q Diamond 荧光染色。

1.4 图谱扫描和分析

银染胶采用 Image Scanner 2D 扫描仪 (Amersham Bioscience) 进行扫描。通过 Image Master 2D platinum 分析软件进行图像分析,检测蛋白质斑点,

并预测其分子质量和等电点。

### 1.5 后部丝腺磷酸化蛋白质谱鉴定和表达分析

挖取 Pro - Q Diamond 荧光染色胶中对应的蛋白质点送交浙江理工大学进行质谱鉴定。胶内酶解参照文献[17]的方法。质谱鉴定采用文献[16]中的方法和参数,质谱仪采用 ABI 公司的 4700 proteomics Analyzer。数据库选用 NCBIInr,搜库软件为 GPS Explore<sup>TM</sup> software。

### 1.6 鉴定蛋白质的磷酸化位点预测

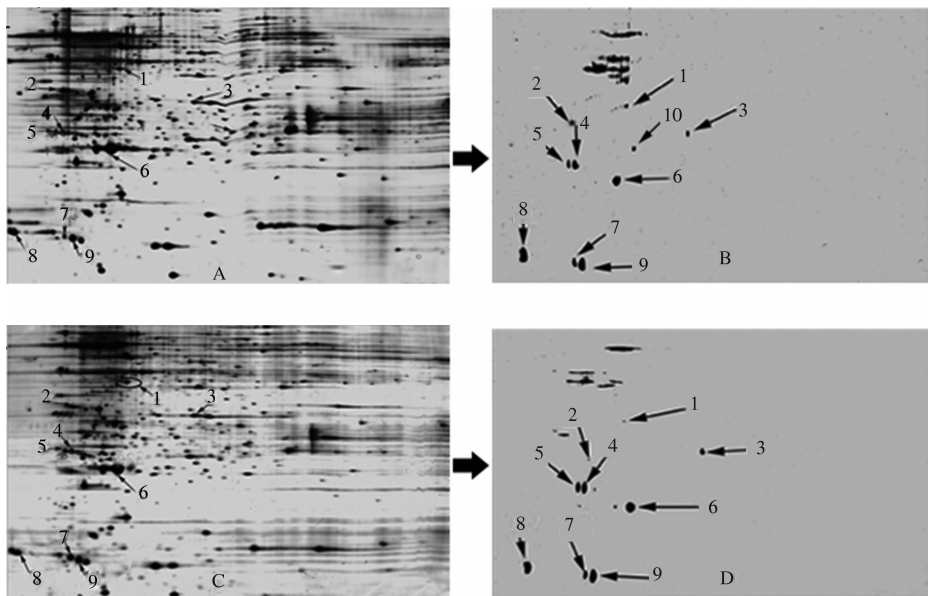
利用 TMHMM Server. v. 2.0 在线软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)对氨基酸序列的跨膜结构域进行分析,SignalP - 4.1 在线软件对氨基酸序列进行信号肽预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>),PBIL 在线软件对氨基酸序列的二级结构进行分析([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_hnn.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html)),SWISS - MODEL 在线软件进行同源建模(<http://swissmodel.expasy.org/>)。利用 UniProt 数据库(<http://www.expasy.org/sprot/>)对磷酸化蛋白进行基因注释,然后根据该数据库的注释信息,利用

InterproScan 搜索引擎(<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>)找出每个蛋白质对应的 Gene Ontology (GO)的编号。利用 GO 在线分析软件 WEGO (<http://wego.genomics.org.cn/>)对所有含有 GO 编号的蛋白质进行 GO 分类分析。最后利用 NetPhos 2.0 Server 在线软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)预测磷酸化位点。

## 2 结果与分析

### 2.1 家蚕后部丝腺磷酸化蛋白图谱分析

从图 1 中可以看出,对照组和热激处理组的后部丝腺蛋白双向电泳图谱点分布情况大致相同,磷酸化蛋白基本分布在 pH 值 4.0 ~ 6.0 的垂直区域,分子质量大小不一。表明,后部丝腺磷酸化蛋白含酸性氨基酸较多,基本为酸性蛋白质。另外,从右侧荧光染色图中可以看出分离较好的蛋白质点有 10 个,而在图谱的偏上部分存在一些不易分离的蛋白质谱带。这些谱带中的蛋白质分子质量普遍比其他的蛋白质偏大(分子质量在 50 ku 以上),含量极为丰富,有可能为同类功能蛋白。



A、B 为对照处理的电泳图谱;C、D 为热激处理的电泳图谱;左侧 A、C 为银染图;右侧 B、D 为 Pro - Q Diamond 荧光染色图

图 1 家蚕后部丝腺磷酸化蛋白图谱

### 2.2 家蚕后部丝腺磷酸化蛋白点的质谱鉴定

对图 1 中分离较好的 10 个蛋白质点进行了凝胶取点、胶内酶切和质谱分析鉴定,成功鉴定了 9 个蛋白质,占鉴定蛋白质总数的 90%。采用 Image Master 2D platinum 分析软件对图谱进行分析发现,经过 10 min 热激处理后,上述 9 个蛋白质均呈现表达下调趋势。这说明短时间热激在一定程度上影响了这些蛋白质的合成。

质谱鉴定结果表明(表 1),所鉴定蛋白质的蛋白质得分以及置信区间均较高,说明鉴定结果具有可靠性。有 4 个蛋白质点为核糖体,3 个蛋白质点为延伸因子,另外 2 个蛋白质分别是蛋白质点 1 的腺苷酸激酶和蛋白质点 6 的轻链丝心蛋白。

此外,分析发现,凝胶上的蛋白质斑点 4、5 以及 7、9 各自被鉴定为同一蛋白质。造成这种现象的原因可能是由于翻译后修饰,比如糖基化、磷酸化、甲基化等。

表 1 热激条件下家蚕后部丝腺磷酸化蛋白质谱鉴定

编号	蛋白质	登录号	数据库	肽段 匹配	蛋白质 得分	置信 区间/%	分子质量 /ku	理论等电点	序列覆 盖度
1	腺苷酸激酶	gi 114051596	NCBIInr	10	130	100	38.1	5.14	21.369
2	延伸因子 EF-1 δ	gi 12328436	NCBIInr	4	96	99.0	28.8	4.41	78.740
3	核糖体蛋白 P0	gi 112982735	NCBIInr	7	262	100	34.1	5.69	57.494
4	延伸因子 EF-1 β′	gi 112982743	NCBIInr	5	105	99.0	24.5	4.49	37.824
5	延伸因子 EF-1 β′	gi 112982743	NCBIInr	4	107	99.9	24.5	4.49	69.938
6	轻链丝心蛋白	gi 13383193	NCBIInr	9	295	100	27.6	5.06	49.079
7	核糖体蛋白 P2	gi 112984336	NCBIInr	3	142	100	11.5	4.68	46.538
8	核糖体蛋白 P1	gi 54609189	NCBIInr	3	95	100	12.0	3.97	73.000
9	核糖体蛋白 P2	gi 112984336	NCBIInr	5	134	100	11.5	4.68	46.538

2.3 家蚕后部丝腺磷酸化蛋白的生物信息学分析

从磷酸化蛋白的结构预测来看,这些蛋白质的二级结构主要以 α 螺旋或无规则卷曲为主,延伸链在所有蛋白质中的比例均不高(表 2)。TMHMM 跨膜结构分析结果显示,所有的磷酸化蛋白均不存在跨膜区(图 2)。SignalP-4.1 分析结果显示,9 个蛋

白质中仅有蛋白质点 6 的轻链丝心蛋白在 16—17 位存在剪切位点,此处 C 值达到最高值,S 值陡峭,Y 值处于最高峰,表明该蛋白质存在信号肽(图 3)。采用 NetPhos 2.0 预测蛋白质的磷酸化位点,发现所有蛋白质都至少存在 1 种磷酸化修饰(表 3)。

表 2 后部丝腺磷酸化蛋白结构预测

编号	名称	二级结构 类型	比例/%	三级结构	编号	名称	二级结构 类型	比例/%	三级结构
1	腺苷酸激酶	α 螺旋	38.68		6	轻链丝心蛋白	α 螺旋	52.67	
		延伸链	20.63				延伸链	6.49	
		无规则卷曲	40.69				无规则卷曲	40.84	
2	延伸因子 EF-1 δ	α 螺旋	49.24		7	核糖体蛋白 P2	α 螺旋	49.11	
		延伸链	14.89				延伸链	3.57	
		无规则卷曲	25.88				无规则卷曲	47.32	
3	核糖体蛋白 P0	α 螺旋	40.82		8	核糖体蛋白 P1	α 螺旋	44.64	
		延伸链	13.92				延伸链	5.36	
		无规则卷曲	45.25				无规则卷曲	50.00	
4	延伸因子 EF-1 β′	α 螺旋	41.89						
		延伸链	11.71						
		无规则卷曲	46.40						

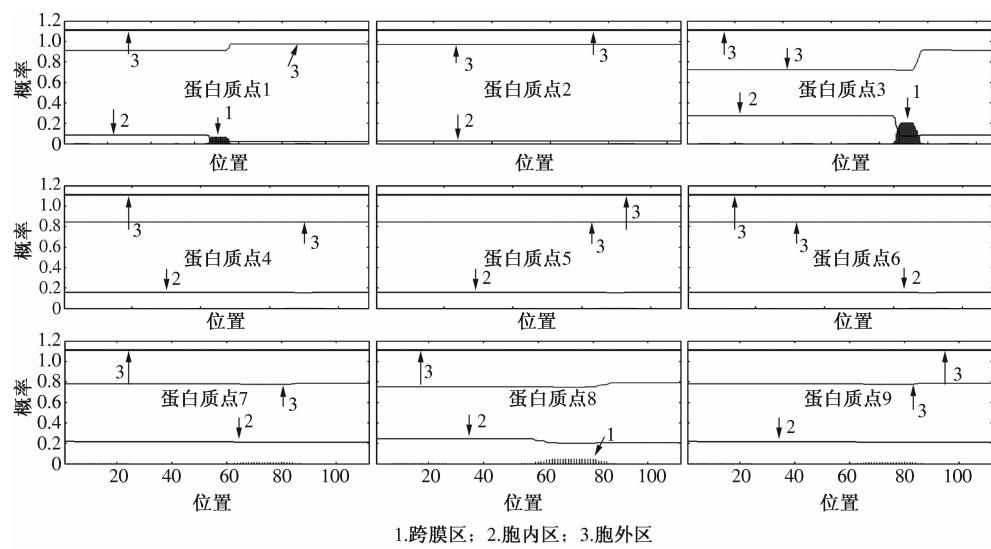


图 2 TMHMM 预测的跨膜结构域

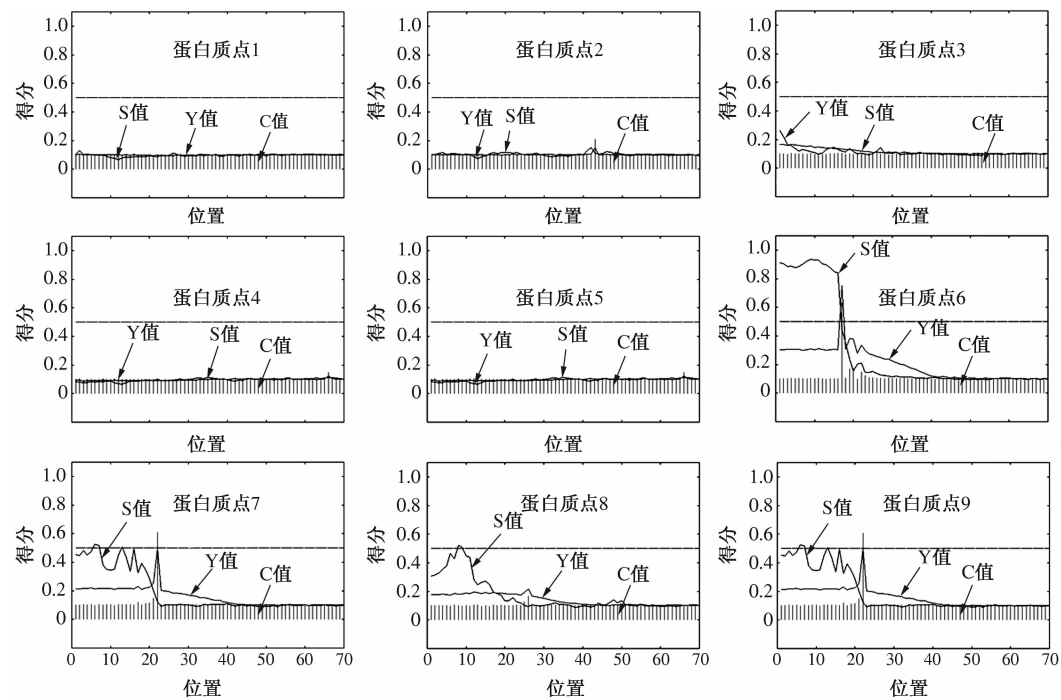


图 3 SignalP-4.1 预测信号肽

表 3 蛋白质磷酸化位点预测

编号	名称	序列和磷酸化位点	合计
1	腺苷酸激酶	MDVSD [S] ICDQEGLLVGIGNPLLDISA [S] VDEDLLKKYDLHPDDAIMAEKHMPL [Y] SELVDKYNAE [Y] IA	Ser: 7 Thr: 2 Tyr: 4
		GGSVQN [S] LRVAQWILKKPNICTYFGCVGNDE [Y] AKLLKERAIADGVHVQYQVSNEVATGTCAVLVTG [T]	
		HRSLCANLGAAQHFTPDHLQKEECK [S] IEAAKFFYASGFFVAV [S] PESILLAQHAHDNGHTFVMNLSAP	
		FVSQFYKEPLEKLLP [Y] VDVLFNE [S] EADAFKAFNINSSDVQEIALRIASMPKLNANRQRVVVITQGCQP	
2	延伸因子 EF-1δ	VVLVQSGRV [T] LIPVEALPRERIHTNGAGDAFTGGYLAQLVLNREPAACVRCAYCATHVIQHPGCTFSGP	Ser: 14 Thr: 2 Tyr: 3
		[S] EYND	
		MAALLHEKVWLDNRVYNDAEKA [YY] ESL [S] KVQAPLSLARS [S] LA [S] EVAKARQHIKN [S] LECMDS-	
		VATLAGVPNTEL [S] TKVI [S] LENENKDLKKAIDDLRLNLVLSLQVRVE [T] LESS [SS] ITSDCIQ [S] EKPAAA	
3	核糖体蛋白 P0	[ST] DKDDEDDVDVDFG [S] DDEE [S] AEAAKIKEERLAAYNAKKAKKPVLIAKSNIILDKPWPDETDMAALE	Ser: 6 Thr: 2 Tyr: 0
		QAVRSI [S] TDGLLWGAAKLVPLAYGIHKLQISCVVEDDKV [S] IDWLTEEIEKNED [Y] VQSVDIAAFNKV	
		MGREDKATWKSNYFVKIQLLDEYPKCFIVGADNVGSQQMQQIRI [S] LRG [S] SIVLMGKNTMMRKAIKDHL	
		DNNPALEKLLPHIKGNVGFVFTRGDLVEVRDKLENNKVQAPARPGAIAPLSVVIPAHTNLGLPEKTSFFQALSI	
4	延伸因子 EF-1β'	PTKISKGTIEHNDVHILKPGDKVGASEATLLNMLNISPFYGLVVKQVYD [S] GTIFAPEILDIKPEDLRKFQAG	Ser: 4 Thr: 2 Tyr: 1
		VANVAALSLAIGYPTIASAPH [S] IANGFKNLLAIAAV [T] EVEFEEAT [T] IKEFIKDP [S] KFAAVAAAVAPS	
		AAAAPAEKKEEKKEEKEEEE [S] DDDMGFLFD	
		MAVGDVKTAQGLNDLNQYLAEKS [Y] V [S] GY [T] PSQADVQVFEQVGKAPAANLPHVLRWYNQIASYT [S] A	
6	轻链丝心蛋白	ERKTWSQG [T] SPLTAGAKPTAPAPAAKDDDDDDVDVDFG [S] GDEEDAEAEERIREERLKAYADKK [S] KKPA	Ser: 7 Thr: 0 Tyr: 3
		LIKSSILLDKPWPDEDTMKEMENQVRTIEMEGLLWGASKLVPGYGINKLQIMCVIEDDKVSDLLTEKIQEF	
		EDFVQSVDIAAFNKI	
		MKPIFLVLLVATSAYAAPSVTINQY [S] DNEIPRIDDDGKAS [S] VISRAWD [Y] VDDTDKSIALNVQEILKDMA	
		[S] QGD [Y] ASQASAVAQTAGIIAHSAGIPGDACAAANVIN [S] YTDGVRSGNFAGFRQSLGPFPHGVGNLN-	
		LINQLVINPGQLRY [S] VGPALGCAGGGRIYDFEAAWDAILASSDSGFLNEE [Y] CIVKRLYNSRN [S] QSNNIAA	
		YITAHLLPPVAQVFHQSGAG [S] ITDLLRGVGNNGNDATGLVANAQRYIAQASQVHV	

续表 3 蛋白质磷酸化位点预测

编号	名称	序列和磷酸化位点	合计
7	核糖体	MRYVAAYLLAVLGKKT [T] PAAADVEKILSSVGIEADGEKLLKVITELNGKDVEQLIAAGREKLS [S] MPVGG-	Ser: 3
	蛋白 P2	GAPAAAAAAPAAAAAEEKKEDKKEEKED [S] E [S] DDDMGFGLFD	Thr: 1 Tyr: 0
8	核糖体	MVSKAELACVYSALILVDDDDVAVTGEKISTILKAAAVDPEYPWPLFAKALEGINVRDLITNIGSGVGAAPAAGG	Ser: 1
	蛋白 P1	APAAAAAGAPAEKKKEEKKEEPEE [S] DDDMGFGLFD	Thr: 0 Tyr: 0

注:□表示磷酸化位点。

GO 分析发现, 9 个磷酸化蛋白中只有 3 个延伸因子没有找到相应的 GO 信息。从图 4 可以看出, 在细胞组成层次上, 磷酸化蛋白主要涉及细胞、细胞部分和细胞内等; 在分子功能层次上, 主要涉及核糖体结构成分和分子结构等; 在生物学进程中, 很

多蛋白质主要参与细胞代谢进程、细胞进程、代谢进程和初级代谢进程。说明后部丝腺的磷酸化蛋白主要集中在胞内参与分子和能量代谢, 主要发挥结构合成功能, 与丝心蛋白的合成密切相关。

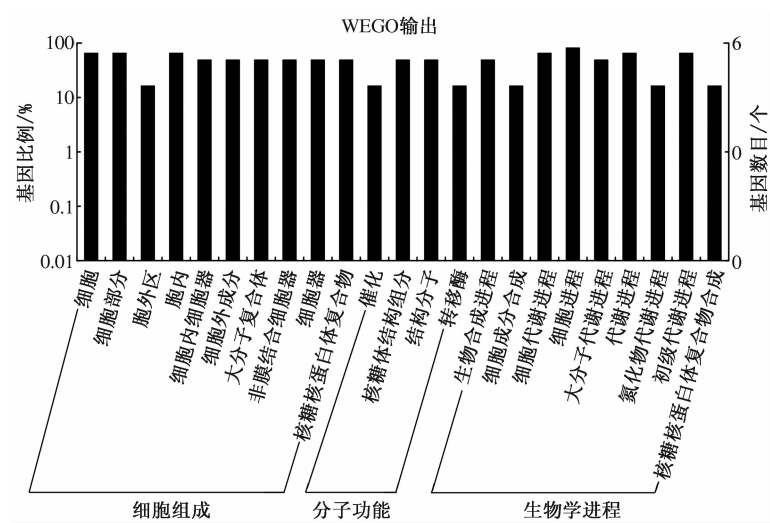


图 4 待鉴定的磷酸化蛋白 GO 分类

3 结论与讨论

通过对热激组和对照组家蚕后部丝腺蛋白质组进行双向电泳和质谱分析, 最终鉴定了 9 个磷酸化蛋白。Image Master 图谱分析表明, 与对照相比, 热激后这些蛋白质的表达量短时间内出现了下降趋势。功能分析结果显示, 除 3 个延伸因子未找到对应的 GO 编号外, 腺苷酸激酶、核糖体蛋白 P0、P1、P2 以及轻链丝心蛋白等 6 个蛋白主要集中在胞内参与分子和能量代谢, 其主要功能为参与结构合成, 与蚕丝的合成密切相关。其中, 腺苷酸激酶 (ADK) 一般被认为是看家酶, 它与腺苷的回收有着直接的关系, 通过使腺苷磷酸化来产生 5'-腺嘌呤核苷酸 (5'-AMP)<sup>[18]</sup>。因为 AMP 能够刺激非发酵蔗糖激酶 1 (sucrose non-fermenting-1 kinase, SNF1) 的活性, 而 AL2/L2 可以使 SNF1 和 ADK 失活, 这可能是一

种双重机制用来对抗 SNF1 参与的非生物刺激<sup>[19]</sup>。核糖体蛋白可以调节 rRNA 的机构和功能<sup>[20]</sup>, 这些蛋白质在老鼠<sup>[21]</sup>、人类<sup>[22]</sup>、卤虫藻<sup>[23]</sup>、林蛙<sup>[24]</sup>、酵母菌<sup>[25]</sup>和家蚕<sup>[26]</sup>中均有报道。另外, 有研究表明, 丝腺延伸因子复合体 EF-1ββ'γ 可催化 GDP 结合到 EF-1α 交换外源 GTP, 同时刺激 EF-1α 依赖氨酰 tRNA 结合核糖体<sup>[27]</sup>。而且, 根据以前的研究结果, EF-2 和 EF-1γ 亚基的表达在人工饲料饲养的家蚕中也呈现下调状态<sup>[16]</sup>。结合本试验及其他生物模型的研究推测, 延伸因子 EF-1β'、EF-1δ 很有可能参与蚕丝的合成。

热激是非常重要的非生物胁迫因子, 异常的温度刺激往往会给生物带来一定的影响, 不仅能制约其正常生长, 严重的还会造成蛋白质磷酸化, 导致生物死亡。热激引起功能蛋白翻译后修饰<sup>[28-31]</sup>, 介导丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸残基的可逆磷酸化, 从而调

节真核生物蛋白质和多肽的功能<sup>[32]</sup>。因此,磷酸化蛋白质组学分析在确认细胞中蛋白质的调节功能上有着巨大的潜力,包括对高温胁迫的应答。磷酸化蛋白在热激后表达量下调,可能是家蚕通过减少蚕丝合成这种复杂的代谢进程来应对高温胁迫的一种机制。另外,本研究借助生物信息学软件对鉴定的磷酸化蛋白进行了分析,对了解这些蛋白的结构、功能以及磷酸化位点提供了参考。

#### 参考文献:

- [1] Nagaraju J. Recent advances in molecular genetics of the silk moth, *Bombyx mori* [J]. Current Science, 2000, 78 (2): 151-161.
- [2] Inoue S, Tanaka K, Arisaka F, et al. Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio [J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275 (51): 40517-40528.
- [3] Grzelak K. Control of expression of silk protein genes [J]. Comparative Biochemistry and Physiology (Part B: Biochemistry & Molecular Biology), 1995, 110 (4): 671-681.
- [4] Li J Y, Yang H J, Lan T Y, et al. Expression profiling and regulation of genes related to silkworm posterior silk gland development and fibroin synthesis [J]. Journal of Proteome Research, 2011, 10 (8): 3551-3564.
- [5] Kobayashi M, Inagaki S, Kawase S. Effect of high temperature on the development of nuclear polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1981, 38 (3): 386-394.
- [6] Aruga H, Tanaka S. Effect of high temperature on the resistance of silkworm, *Bombyx mori* to flacherie-virus disease [J]. Jour Sericult Sci Jap, 1968, 37: 441-444.
- [7] Krieg A. Diseases caused by bacteria and other prokaryotes [J]. Epizootiology of Insect Diseases, 1987, 8: 323-355.
- [8] Watanabe H. Resistance of the silkworm, *Bombyx mori*, to viral infections [J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 1986, 15 (2/3): 131-139.
- [9] Altenbach S B. New insights into the effects of high temperature, drought and post-anthesis fertilizer on wheat grain development [J]. Journal of Cereal Science, 2012, 56 (1): 39-50.
- [10] Raveendran M, Jagadish K V, Craufurd P Q, et al. Proteomic response of rice floral organs and lemma-palea to high temperature stress [J]. Gene, Genomes and Genomics, 2012, 6 (1): 22-25.
- [11] Wang L, Ma H, Song L, et al. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress [J]. Journal of Proteomics, 2012, 75 (7): 2109-2127.
- [12] Yang Y, Chen J, Liu Q, et al. Comparative proteomic analysis of the thermotolerant plant *Portulaca oleracea* acclimation to combined high temperature and humidity stress [J]. Journal of Proteome Research, 2012, 11 (7): 3605-3623.
- [13] Raggiaschi R, Gotta S, Terstappen G C. Phosphoproteome analysis [J]. Bioscience Reports, 2005, 25 (1/2): 33-44.
- [14] Wu H Y, Tseng V S, Liao P C, et al. Mining phosphopeptide signals in liquid chromatography-mass spectrometry data for protein phosphorylation analysis [J]. Journal of Proteome Research, 2007, 6 (5): 1812-1821.
- [15] 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 (2): 248-254.
- [16] Zhou Z H, Yang H J, Chen M, et al. Comparative proteomic analysis between the domesticated silkworm (*Bombyx mori*) reared on fresh mulberry leaves and on artificial diet [J]. Journal of Proteome Research, 2008, 7 (12): 5103-5111.
- [17] Gharahdaghi F, Weinberg C R, Meagher D A, et al. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity [J]. Electrophoresis, 1999, 20 (3): 601-605.
- [18] Wang H, Hao L, Shung C Y, et al. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins [J]. The Plant Cell, 2003, 15 (12): 3020-3032.
- [19] Wang H, Buckley K J, Yang X, et al. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins [J]. Journal of Virology, 2005, 79 (12): 7410-7418.
- [20] Noller H. Ribosomal RNA and translation [J]. Annual Review of Biochemistry, 1991, 60 (1): 191-227.
- [21] Wool I G, Chan Y L, Glück A, et al. The primary structure of rat ribosomal proteins P0, P1, and P2 and a proposal for a uniform nomenclature for mammalian and yeast ribosomal proteins [J]. Biochimie, 1992, 73 (7/8): 861-870.
- [22] Rich B E, Steitz J A. Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1, and P2: Analysis of cDNA clones, *in vitro* synthesis, and assembly [J]. Molecular and Cellular Biology, 1987, 7 (11): 4065-4074.