

宋宇航, 白旭, 冯嘉伟, 等. 高、低温催青诱导家蚕滞育发生中的蛋白质修饰 [J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(2): 34-41.
SONG Yuhang, BAI Xu, FENG Jiawei, et al. Protein modification in the diapause occurrence of *Bombyx mori* induced by high or low temperature incubation[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(2): 34-41.

高、低温催青诱导家蚕滞育发生中的蛋白质修饰

宋宇航¹, 白旭¹, 冯嘉伟¹, 尹延萍¹, 肖阳², 杨婉莹¹, 钟仰进¹

(1 华南农业大学 动物科学学院/广东省农业动物基因组学与分子育种重点实验室, 广东 广州 510642;

2 广东省农业科学院 蚕业与农产品加工研究所, 广东 广州 510640)

摘要:【目的】研究高、低温诱导家蚕 *Bombyx mori* 滞育发生时蚕卵蛋白质修饰的差异, 为后续深入探究昆虫滞育诱导的分子机制提供参考。【方法】饲养二化性家蚕品种, 筛选出稳定的受高、低温诱导滞育发生的家蚕品系。以此为材料, 分别于 25 和 15 ℃ 孵化蚕卵, 敏感期和点青期取样进行表观遗传学研究, 通过 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 检测蛋白修饰的差异。【结果】高温 (25 ℃) 组蚕卵蛋白的甲基化修饰水平始终高于低温 (15 ℃) 组, 点青期有显著差异; 高、低温处理组之间的乙酰化修饰水平一直差异显著, 在点青期高温组显著低于低温组; 低温组的泛素化修饰水平始终高于高温组, 尤其是发育前期; 磷酸化修饰水平整体较高, 但高、低温处理组之间差异不显著; 丙二酰化在高、低温处理组之间没有明显差异; 琥珀酰化的修饰水平始终较低, 在发育后期有明显的差异修饰蛋白出现。【结论】蚕卵在 25 ℃ 催青过程中蛋白质泛素化和乙酰化修饰水平与 15 ℃ 低温组在全时期都存在显著差异, 甲基化修饰水平在点青期存在显著差异, 表明甲基化、泛素化和乙酰化修饰在家蚕早期滞育诱导过程中起作用。

关键词: 家蚕; 滞育诱导; 蛋白质修饰; 催青; 点青期

中图分类号: Q966

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2022)02-0034-08

Protein modification in the diapause occurrence of *Bombyx mori* induced by high or low temperature incubation

SONG Yuhang¹, BAI Xu¹, FENG Jiawei¹, YIN Yanping¹, XIAO Yang², YANG Wanying¹, ZHONG Yangjin¹

(1 College of Animal Science, South China Agricultural University/Agricultural Animal Genomics and Molecular Breeding

Laboratory of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China; 2 Institute of Sericulture and Agricultural Products

Processing, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: 【Objective】To study the difference of protein modification of silkworm(*Bombyx mori*) eggs during diapause induced by high or low temperature, and provide references for further exploration of molecular mechanism of insect diapause induction. 【Method】The stable diapause silkworm strains induced by high or low temperature were screened out by raising the bivoltine silkworm varieties. Using the selected strains as materials, the eggs were incubated at 25 and 15 ℃ respectively. Samples were taken at the sensitive stage and the head pigmentation phase for epigenetic studies. The differences of protein modification were detected by SDS-PAGE electrophoresis and Western blot. 【Result】The methylation level of protein in silkworm eggs in high temperature (25 ℃) group was always higher than that of low temperature (15 ℃) group, and there was

收稿日期: 2021-04-15 网络首发时间: 2022-01-04 09:26:14

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20211231.1620.002.html>

作者简介: 宋宇航, 硕士研究生, 主要从事家蚕滞育研究, E-mail: 431900824@qq.com; 通信作者: 钟仰进, 教授, 主要从事家蚕生理生化研究, E-mail: zhongyj@scau.edu.cn

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金 (2021A1515012090)

significant difference at the head pigmentation phase. The levels of acetylation modification had always been significantly different between high and low temperature groups, and the high temperature group had significantly lower level compared with the low temperature group at the head pigmentation phase. The ubiquitination level of the low temperature group was always higher than that of the high temperature group, especially in the early stage of development. The levels of phosphorylation modification of both groups were high overall, and there was no significant difference between high and low temperature groups. The malonylation levels of protein in silkworm eggs did not change significantly between high and low temperature groups. The levels of succinylation modification of high and low temperature groups were always low, and there were obvious differential modification proteins in late developmental stage. 【Conclusion】 There are significant differences in the protein ubiquitination and acetylation modification level of silkworm eggs incubated at 25 °C compared with those at 15 °C throughout development, and the levels of methylation are significantly different at the head pigmentation phase, suggesting that methylation, ubiquitination and acetylation play important roles in early diapause induction process of silkworm.

Key words: *Bombyx mori*; Diapause induction; Protein modification; Incubation; Head pigmentation phase

昆虫滞育 (Diapause) 是指昆虫在感受到环境的不良信号后, 生长发育进入停滞的状态。滞育不仅能帮助昆虫躲避不良环境, 还能使其发育整齐, 增加繁殖几率, 保证种群繁衍^[1]。不同昆虫滞育发生的阶段不同, 可分为卵滞育、幼虫滞育、蛹滞育以及成虫滞育^[2]。

二化性家蚕 *Bombyx mori* 是典型的卵滞育昆虫, 由滞育激素 (Diapause hormone, DH) 调控。DH 由蛹至成虫发育过程中咽下神经节 (Suboesophageal ganglion, SG) 的 12 个神经细胞表达合成。成熟的 DH 只有 24 个氨基酸, 这个小分子多肽由心侧体至咽侧体释放到血淋巴^[3-5], 继而被血淋巴转运到雌性蚕蛹的卵巢, 与卵巢上的 DH 受体 (Diapause hormone receptor, DHR) 结合, 使第二信使鸟苷酸环化酶 (cAMP) 活性下降^[6], 导致血淋巴中大量海藻糖被分解成葡萄糖, 形成糖原。糖原被分解后合成山梨醇、甘油等有机物。家蚕产卵, 并以蚕卵状态进入滞育期^[7-9]。

二化性家蚕的滞育特性受母体遗传和外界环境调控。当蚕卵在 25 °C 长光照中孵化时, 其发育而成的雌蛾会产下滞育卵; 而在 15 °C 长黑暗条件下孵化的蚕卵, 其后代是非滞育卵; 当蚕卵在 20 °C 孵化时, 长光照 (16 h 以上) 会产生滞育卵, 而短光照 (8 h 以下) 会产生非滞育卵^[10-11]。因此, 家蚕卵是否滞育主要受母体基因及所处环境的温度影响。近年来, 研究者通过高通量测序发现许多信号通路参与滞育诱导, 如激素控制^[12-13]、昼夜节律和光周期^[14-15]以及能量利用途径等^[16-17]。但是将筛选到的关键基因进行 RNA 干扰后, 对子代滞育影响并不明显, 说明家蚕滞育诱导是一个复杂的调控进程, 对其分子

机制的研究仍不清楚。

亲代经历的热应激反应可以通过表观遗传效应跨代遗传给下一代^[18]。表观遗传是指在基因 DNA 序列没有改变的情况下, 基因功能发生了可遗传的变化, 这种变化在细胞分裂甚至隔代遗传中保持稳定。已知的表观遗传现象有 DNA 甲基化、组蛋白修饰、基因组印记、非 RNA 编码等和母体效应等^[19]。家蚕滞育诱导受母体效应机制调控, 为了探讨表观遗传修饰在家蚕滞育诱导发生中的作用机制, 我们筛选了受温度调控滞育发生的二化性家蚕品种, 将蚕卵分别放置在 25 和 15 °C 催青, 收集不同积温点的蚕卵, 抽提蛋白, 进行甲基化、磷酸化、乙酰化等抗体的 Western blot 检测。研究蛋白质修饰在家蚕滞育诱导中的作用, 研究结果将为家蚕的滞育分子机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 家蚕饲养

供试家蚕二化性品种: P50 由中国科学院蚕业研究所徐安英研究员提供, 大造 (Dazao) 由广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所提供。将其蚕卵分别放在 25 和 15 °C 催青孵化后, 幼虫期置于 26~28 °C、相对湿度 60%±5%、12 h 日夜交替的环境下用新鲜桑叶饲喂至上簇。出蛾交配 6 h 后产卵。然后将这些蚕卵置于 25 °C 气候箱, 10 d 后观察蚕卵滞育状况, 统计滞育卵、混合卵和非滞育卵的卵圈数量。

1.2 试剂

甲基化赖氨酸泛抗体、乙酰化赖氨酸泛抗体、磷酸化赖氨酸泛抗体、泛素化泛抗体、丙二

酰化赖氨酸泛抗体和琥珀酰化赖氨酸泛抗体购自杭州景杰生物科技有限公司; SDS、BSA、Tris、二乙醇胺、尿素等购自广州翔博生物科技有限公司; BCA 法蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、PR-619、TSA 和 NAM 购自上海蓝木化工有限公司。

1.3 蚕卵的浸酸处理

将二化性家蚕品种 P50 的蚕卵放在 25 ℃ 气候箱中催青, 饲喂 1 代后产下滞育卵。将滞育卵在产卵 20 h 后进行浸酸处理, 在 1.075 g/L (46.1 ℃) 的盐酸溶液中浸泡 4.5 min, 随即放在流动的水中浸泡 30 min, 冲洗干净后放置在 25 ℃ 晾干。随后将解除滞育的蚕卵分成 2 组, 一组置于 25 ℃ 气候箱中明催青 (高温滞育诱导组), 另一组置于 15 ℃ 气候箱中暗催青 (低温非滞育诱导组)。高温滞育诱导组分别在 25 ℃ 催青后的第 4、5、6 和 8 天 (点青期) 取样; 低温非滞育诱导组分别与与滞育诱导组相同积温处取样。将蚕卵样品放于 -80 ℃ 冰箱储存备用。

1.4 蚕卵蛋白质的抽提

将“1.3”中取样的蚕卵样品, 各组称取同等质量放至液氮预冷的研钵中, 加液氮充分研磨成粉末。各组样品分别加入 4 倍体积的酚抽提缓冲液 [含质量分数为 1% 的蛋白酶抑制剂和 1% 的磷酸酶抑制剂、50 μmol/L PR-619、3 μmol/L 曲古柳菌素 (TSA) 和 50 mmol/L 烟酰胺 (NAM)], 超声裂解。加入等体积的 Tris 平衡酚, 4 ℃、6000 r/min 离心 10 min, 取适量上清液, 加入 5 倍体积含 0.1 mol/L 乙酸铵的甲醇溶液沉淀过夜。蛋白沉淀分别用甲醇和丙酮进行洗涤, 最后沉淀用 8 mol/L 尿素复溶。

1.5 蛋白质浓度测定

取蚕卵蛋白, 使用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度, 方法如下: 将 0、5、10、15、20 μL 标准品加到酶标条的样品孔中, 加样品稀释液补足至 20 μL, 各检测 3 个复孔; 同时将 5 μL 待测蛋白样品加到酶标条的样品孔中, 加样品稀释液补足至 20 μL, 各检测 3 个复孔; 在孔里加入 200 μL BCA 工作液, 37 ℃ 条件下静置反应 30 min。用酶标仪测定 $D_{570\text{nm}}$ 。根据标准曲线和使用的样品体积计算出样品的蛋白质质量浓度。

1.6 SDS-PAGE 电泳检测

蛋白胶由质量分数为 12% 的蛋白分离胶和 5% 的蛋白浓缩胶组成。根据蛋白质浓度测定结

果, 每个样品取等量蛋白到离心管中, 加入 5 μL 4× Loading buffer, 再加入质量分数为 2% 的 SDS 溶液使终体积为 20 μL; 依次在蛋白胶胶孔上样 1 μL 预染蛋白 Marker 和 20 μL 蛋白样品。浓缩胶在 15 mA 电流下电泳 15 min, 将蛋白浓缩为 1 条线。分离胶 35 mA 电流下电泳至 Loading buffer 到胶底部。胶取出后放在考马斯亮蓝 R-250 染液中室温染色 2 h, 然后加入脱色液, 脱色至背景无色、条带清晰。

1.7 蛋白质修饰的 Western blot 检测

取 30 μg 蛋白质样品, 加入 4×Sample buffer, 调至 1×, 样品配制质量浓度控制在 2 g/L, 95 ℃ 加热 10 min。依次在蛋白胶胶孔上样 1 μL 预染蛋白 Marker 和 20 μg 蛋白样品, 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 先 80 V 恒压 30 min, 再 120 V 恒压电泳至溴酚蓝刚跑出分离胶。将胶平铺于经转膜液浸泡的 NC 膜上, 随后将转印夹按正确电极方向放入电转槽。4 ℃、80 V 恒压电转 2 h。再用含 5% (ω) 脱脂奶粉的 TBST 溶液进行封闭, 室温封闭 1 h。封闭结束, 使用 TBST 溶液漂洗 3 次, 每次 10 min。再使用含 5% (ω) 脱脂奶粉的 TBST 溶液稀释抗体, 加入抗体后置于 4 ℃ 冰箱, 温和摇晃孵育过夜。一抗孵育结束后, 使用 TBST 溶液漂洗 3 次, 每次 10 min。加入二抗, 室温孵育 1 h。二抗孵育结束, 用 TBST 溶液漂洗 3 次, 每次 10 min。加入荧光底物孵育 5 min, 用自封袋覆盖在膜上, 放入暗盒曝光。

2 结果与分析

2.1 二化性家蚕滞育性统计

为了筛选稳定的受温度调控的二化性家蚕品种进行滞育研究, 我们分别统计了大造和 P50 蚕卵在 25 和 15 ℃ 催青孵化后的子代滞育情况, 统计结果如图 1 所示。25 ℃ 催青孵化的大造产下的滞育卵圈占 42.9%, 混合卵圈占 7.1%, 非滞育卵圈占 50.0%; 15 ℃ 催青孵化的大造产下的滞育卵圈占 32.1%, 混合卵圈占 7.1%, 非滞育卵圈占 60.8%, 说明大造的滞育不完全受温度调控。25 ℃ 催青孵化的 P50 可以产下 100.0% 滞育卵, 15 ℃ 催青孵化时产下 100.0% 非滞育卵。后续分别在夏秋季继续养蚕重复该试验, 二化性家蚕 P50 的卵滞育表型可以稳定地受温度调控, 因此后续试验选择使用 P50 进行。滞育的 3 种类型如图 2 所示。

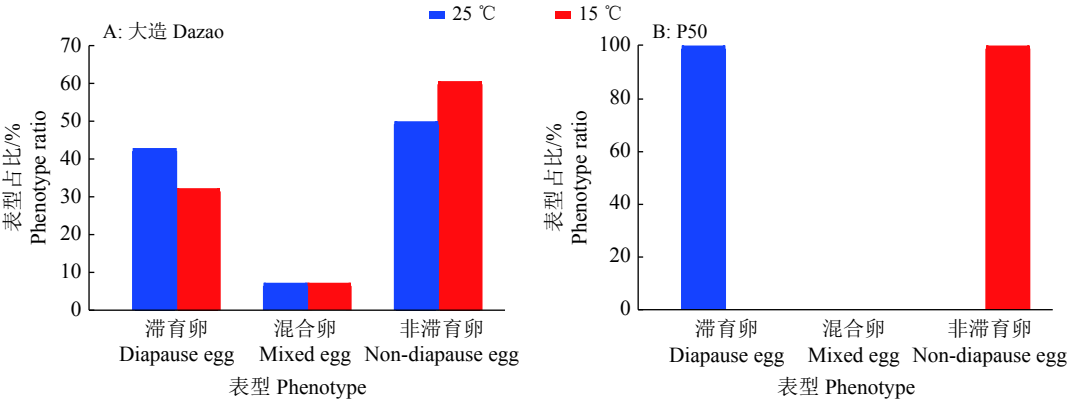


图 1 不同品种家蚕高、低温催青后代滞育型统计

Fig. 1 The statistics of diapause type of offspring of different *Bombyx mori* varieties incubated at high or low temperature



图 2 3 种家蚕蚕卵类型图片

Fig. 2 Pictures of three types of *Bombyx mori* eggs

2.2 蛋白浓度测定结果

Sato 等^[20]通过温度交换试验确定了二化性家蚕 Kosetsu 在 25 °C 催青的敏感期为第 3.5~5.5 天,昆虫的滞育诱导是在敏感期完成的,15 °C 催青的敏感期在第 12~20 天。我们在前期饲养过程中发现 P50 在 15 °C 催青时发育比 Kosetsu 略快,因此选取了 25 °C 催青 4、5、6 和 8 d 点青期的蚕卵蛋白

作为样品进行检测,计算出这 4 个取样点的积温分别为 66.8、82.0、100.2、133.6 °C。15 °C 催青组分别按相同积温进行取样。抽提蛋白后,取 5 μL 蛋白样品,通过 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。根据标准曲线,计算获得每个样品的蛋白质质量浓度和蛋白质质量,结果如表 1 所示。

表 1 高、低温催青家蚕蚕卵的蛋白含量

Table 1 Protein content of *Bombyx mori* eggs incubated at high or low temperature

发育时期 Developmental period	积温/°C Accumulated temperature	$\theta_{\text{催青}}/\text{°C}$ Incubation temperature	$t_{\text{催青}}/\text{d}$ Incubation time	$\rho(\text{蛋白})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ Protein content	$V(\text{样品})/\mu\text{L}$ Sample volume	$m(\text{蛋白})/\mu\text{g}$ Protein mass
敏感期 Sensitive period	66.8	25	4.0	5.2	500	2616
		15	10.0	4.6	500	2307
	82.0	25	5.0	4.3	500	2164
		15	12.5	4.5	500	2241
点青期 Head pigmentation phase	100.2	25	6.0	3.3	500	1650
		15	15.0	8.4	500	4196
	133.6	25	8.0	9.0	500	4525
		15	20.0	7.6	500	3820

2.3 蚕卵蛋白的 SDS-PAGE 电泳检测

通过 SDS-PAGE 电泳后,进行考马斯亮蓝染色、脱色检测抽提蛋白质量,结果如图 3 所示。从图

中可以看出抽提的蛋白电泳条带清晰、均一,蛋白无降解,组内各泳道平行性好,可以用于后续的蛋白质修饰检测试验。同时电泳结果也显示,在胚胎

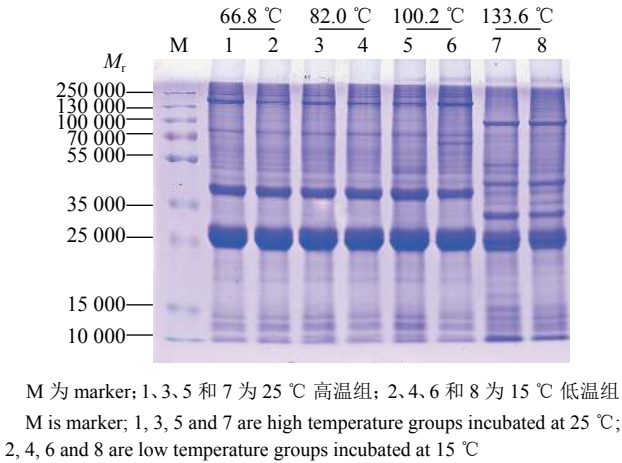


图 3 高、低温催青的不同积温蚕卵蛋白的 SDS-PAGE 电泳检测

Fig. 3 SDS-PAGE detection of protein in *Bombyx mori* eggs with different accumulated temperature incubated at high or low temperature

发育前期, 积温分别为 66.8 和 82.0 °C 时, 25 和 15 °C 催青组的蚕卵蛋白电泳条带相似; 积温在 100.2 °C 时, 高、低温处理组出现差异条带。在蚕卵孵化前的点青期, 蛋白条带与发育前期明显不同, 说明这个

时期的胚胎发生了急剧的生理生化改变, 蛋白质代谢加速。

2.4 高、低温催青 P50 蚕卵的蛋白修饰检测

将上述高、低温催青孵化的蚕卵蛋白定量, 取 20 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 分别用甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、丙二酰化和琥珀酰化抗体进行 Western blot 杂交, 相同曝光时长下检测高、低温催青蚕卵蛋白质的蛋白修饰差异, 同时对各种蛋白质修饰水平进行扫描定量。

家蚕胚胎期蛋白质的甲基化修饰水平在发育前期 4、5、6 d (积温分别为 66.8、82.0、100.2 °C) 时非常低, 到 8 d 点青期 (积温为 133.6 °C) 时突然增高, 对条带进行灰度扫描比较发现, 25 °C 高温组的甲基化修饰水平一直高于相同积温下的 15 °C 低温组, 但只有在点青期时, 2 组处理之间有显著差异 (图 4A、5A)。

对蛋白质乙酰化修饰研究最多的是对组蛋白的修饰, 我们的检测发现 25 °C 催青组蚕卵的乙酰化修饰水平在积温为 66.8 °C 时低于 15 °C 催青组蚕卵, 积温为 82.0、100.2 °C 时稍高于 15 °C 催青

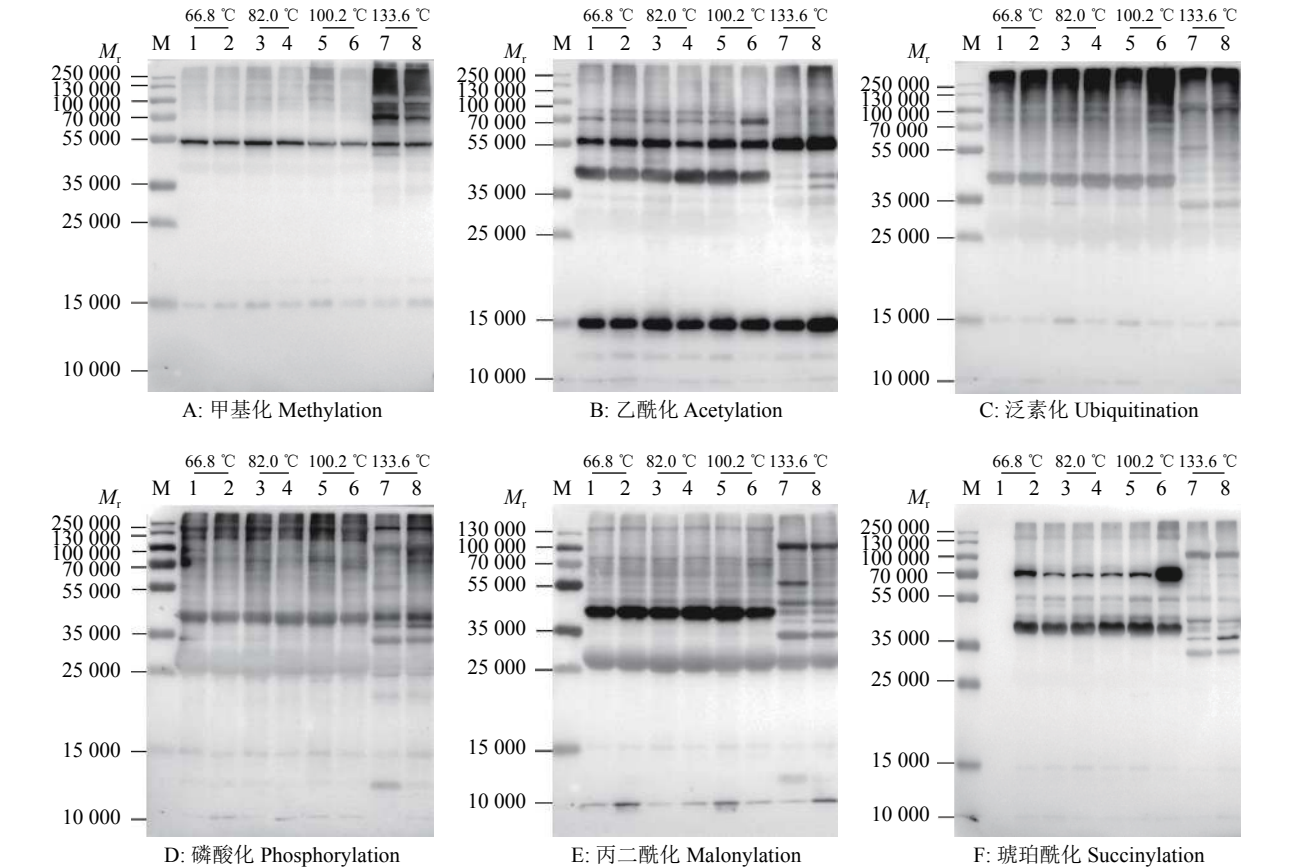
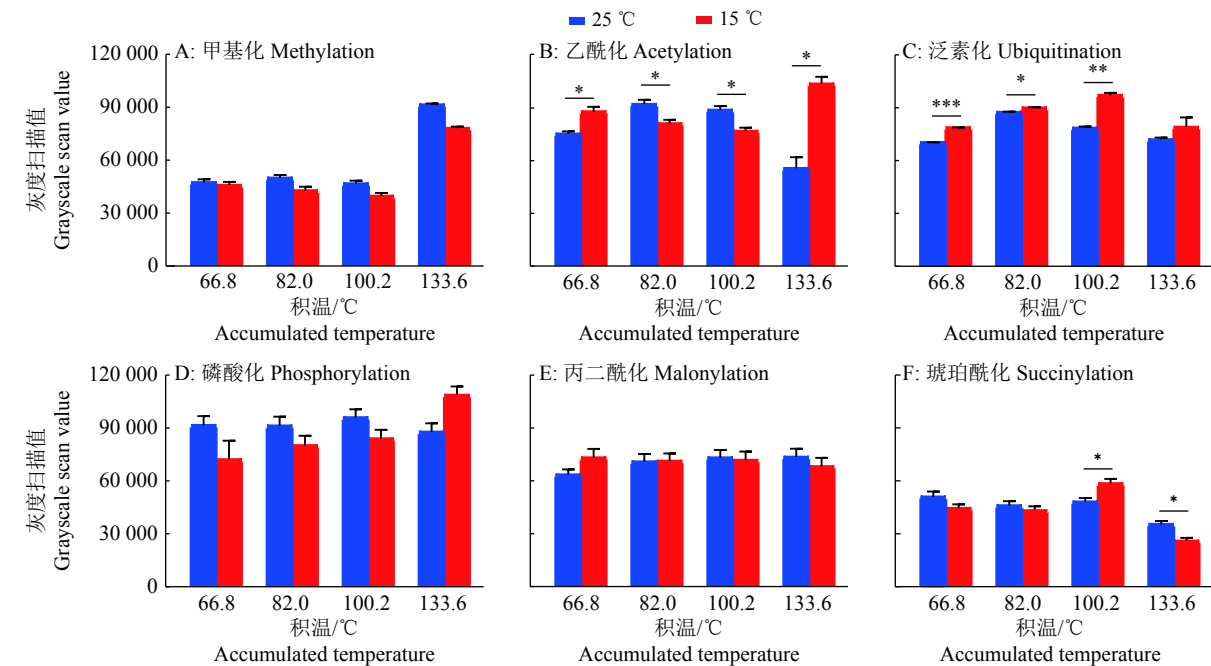


图 4 高、低温催青的不同积温家蚕蚕卵的蛋白修饰检测

Fig. 4 Detection of protein modification of *Bombyx mori* eggs with different accumulated temperature incubated at high or low temperature



图中数据为 3 次重复的平均值±标准误; “*” “**” “***” 分别表示 25 和 15℃ 组间差异达到 0.05、0.01 和 0.001 的显著水平 (t 检验)
Data in the figure are means±standard errors of three replicates; “*” “**” and “***” indicate significant differences between 25 and 15℃ groups at 0.05, 0.01 and 0.001 levels, respectively (t test)

图 5 高、低温催青的不同积温家蚕卵的蛋白修饰灰度扫描图

Fig. 5 Gray-scale scanning image of protein modification of *Bombyx mori* eggs with different accumulated temperature incubated at high or low temperature

组,而在点青期(积温为 133.6℃)又显著低于 15℃催青组蚕卵,在整个发育时期 2 组处理之间都存在显著差异(图 4B、5B)。

泛素化修饰主要参与蛋白质降解,其修饰水平在蚕卵整个催青发育过程中表现稳定,且 25℃催青组蚕卵蛋白的泛素化修饰水平在积温为 66.8 和 100.2℃时极显著低于 15℃催青的蚕卵,在积温为 82.0℃时显著低于 15℃催青的蚕卵,在点青期(积温为 133.6℃)虽然低于 15℃催青组,但不存在显著性差异。分析原因可能是为应对 15℃低温逆境,家蚕胚胎细胞通过降解细胞器和蛋白质以维持基本的生存,因此泛素化修饰水平高,家蚕胚胎生长发育迟缓(图 4C、5C)。

从图 4D、5D 中可以看出磷酸化修饰水平在整个胚胎发育期都非常高,说明磷酸化修饰作为一种基本修饰形式参与到生长发育的生理生化反应中。在 25℃催青组积温为 66.8、82.0 和 100.2℃时,磷酸化高于 15℃催青组,在点青期(积温为 133.6℃)低于 15℃催青组,但比较发现 2 种处理之间不存在显著性差异。

丙二酰化修饰水平在蚕卵胚胎期较高,但高、低温处理组间没有明显差异(图 4E、5E);琥珀酰化修饰在蚕卵胚胎期发生水平较低,但在积温为 100.2℃时,15℃催青处理组蚕卵蛋白在相对分子质量为

70 000 的琥珀酰化修饰明显增多,使这一积温处总体的琥珀酰化修饰显著增高。点青期(积温为 133.6℃)时,2 组处理之间带型差异明显,15℃催青组的蚕卵蛋白在相对分子质量为 35 000 处有明显修饰(图 4F、5F),说明琥珀酰化修饰可能发生在一些特异功能蛋白上。

3 讨论与结论

家蚕滞育诱导是自身在胚胎期感受到外界环境信号,经中枢神经系统接收整合并调节自身内分泌系统,导致体内各种生理生化特性发生变化,并决定下一代是否滞育^[16,21]。这种调控属于跨代效应,往往通过蛋白质修饰来实现^[22-23]。我们通过 Western blot 检测了 25 和 15℃催青后蚕卵蛋白质的甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、丙二酰化和琥珀酰化修饰水平,其中,甲基化、乙酰化、泛素化、琥珀酰化修饰水平差异明显,而磷酸化和丙二酰化修饰水平差异不明显。

甲基化修饰是一种常见的蛋白质和 DNA 修饰形式。DNA 甲基化不仅调控生物的生长发育,而且参与了生物对逆境胁迫的应答^[23-24]。近年来的研究表明 DNA 甲基化和组蛋白的甲基化参与昆虫滞育诱导的调控。如 RNA 干扰丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 的 DNA 甲基转移酶 1a(Dnmt1a) 和 DNA 甲基转移酶 3(Dnmt3) 会破坏其由光周期诱导的滞育反应^[19]。在果蝇 *Drosophila* 3 龄幼虫前 3 d

干扰其 *Dpy-30* 基因,会导致组蛋白 H3(H3K4) 甲基化活性下降,且组蛋白去甲基化酶基因 *LSD1*、*Su(var)3-9* 的表达量显著上调,随后的生长发育中会出现滞育表型^[25]。Egi 等^[26]用 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-氮杂胞苷处理家蚕幼虫和柞蚕 *Antherea pernyi* 滞育蛹,发现药物处理对短日滞育维持和长日羽化无显著影响,说明 DNA 甲基化在家蚕光周期引起的滞育中不起作用,暗示 DNA 甲基化并没有参与家蚕滞育诱导的调控。但在我们对蛋白质的甲基化修饰筛查发现,25℃ 催青处理下的 4 个关键时间点中,蚕卵蛋白的甲基化水平始终高于 15℃ 催青组,到孵化前的点青期则是显著更高,说明蛋白质甲基化可能参与了滞育诱导的调控,至于是否是通过组蛋白的甲基化修饰诱导滞育发生则需要进一步通过蛋白质修饰组学进行研究。

蛋白质乙酰化是指蛋白质在乙酰基转移酶的催化下把乙酰基团共价结合到底物蛋白质的氨基酸残基上,与蛋白质去乙酰化形成可逆性修饰过程。组蛋白修饰具有调控基因表达、维持基因组和染色体的结构和稳定性的作用,其中组蛋白乙酰化修饰对染色体结构的影响及转录调控是研究最为深入的领域^[27]。近年来的研究发现,昆虫常通过改变体内组蛋白修饰基因表达量的方式间接参与滞育诱导的调控。如地蟋蟀 *Allonemobius socius* 的组蛋白乙酰化基因 *reptin* 在不同发育阶段始终处于动态变化水平,Reynolds 等^[28]发现在滞育诱导期 *reptin* 基因的转录表达显著上调,滞育后则急剧下调。我们的结果表明在家蚕胚胎发育期蛋白质乙酰化修饰水平总体上较高,在 25℃ 和 15℃ 催青组的不同发育阶段处于动态变化中。在蚕卵孵化前的点青期,25℃ 催青组蚕卵蛋白的乙酰化修饰水平显著低于 15℃ 催青组,猜测蛋白质乙酰化修饰可能对调节自身发育起着重要作用。接下来我们将通过蛋白质质谱技术进一步筛查发生乙酰化修饰差异的蛋白质,分析其与家蚕滞育诱导的关系。

蛋白质的泛素化修饰是通过泛素-蛋白酶系统 (Ubiquitin-proteasome system, UPS) 介导参与的一种调节蛋白质降解过程^[29]。泛素化修饰主要发生在赖氨酸 (Lysine, Lys) 残基上,对细胞分化、调控、生物合成、细胞凋亡和免疫应激反应等生理过程起着重要作用^[30]。在本试验中 25℃ 催青组的泛素化水平始终低于 15℃ 催青组,说明低温处理对蚕卵是一种不良环境刺激,泛素化修饰始终参与了这个应激反应过程。蛋白质的磷酸化修饰是研究最为广泛的一种修饰方式,广泛参与到生命活动的各种生理过程,如细胞内信号转导、细胞增殖、发育与分化等^[31]。在催青的前期,25℃ 处理组的磷酸化修饰水平高于 15℃ 处理组,说明 25℃ 催青时细胞内生命活动较

15℃ 催青组的频繁,低温组的细胞分裂、增殖和分化等活动变缓。

丙二酰化和琥珀酰化修饰作为新被发现的蛋白质修饰类型,它们的修饰都发生在 Lys 残基上,通过在 Lys 上添加丙二酰基团或者琥珀基团改变蛋白质的电荷数和构象,从而影响其功能^[32-33]。本试验中,高、低温处理组之间丙二酰化修饰差异并不明显,说明丙二酰化修饰在滞育诱导过程中并没起到关键作用。琥珀酰化已被证实参与脂肪酸合成和氧化、线粒体呼吸和糖酵解等多种代谢途径^[34]。本试验中,在 6 d (积温为 100.2℃) 时,25℃ 处理组的琥珀酰化修饰水平显著低于 15℃ 处理组,而在点青期又显著高于低温组,说明代谢途径可能参与了滞育诱导的调控。

本研究通过比较高、低温催青家蚕蚕卵的不同蛋白修饰种类,发现高温 25℃ 催青蚕卵相比低温 15℃ 催青的蚕卵,其乙酰化和泛素化修饰水平在整个时期都存在显著性差异,而甲基化修饰水平却始终高于低温 15℃ 催青的蚕卵,且点青期差异极显著,这与跨代热可塑性结果类似,猜测组蛋白甲基化、泛素化和乙酰化可能在其中起到了作用。未来计划通过蛋白质质谱技术进一步检测这 2 种蛋白质修饰的关键蛋白,为家蚕滞育诱导的分子机理解析提供参考。

参考文献:

- [1] DENLINGER D L. Regulation of diapause[J]. *Annual Review of Entomology*, 2002, 47: 93-122.
- [2] 徐卫华. 昆虫滞育的研究进展[J]. *昆虫学报*, 1999, 42(1): 512-517.
- [3] IMAI K, KONNO T, NAKAZAWA Y, et al. Isolation and structure of diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 1991, 67(6): 98-101.
- [4] XU W H, SATO Y, IKEDA M, et al. Molecular characterization of the gene encoding the precursor protein of diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide (DH-PBAN) of the silkworm, *Bombyx mori* and its distribution in some insects[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995, 1261(1): 83-89.
- [5] YAMASHITA O. Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: Structure, gene expression and function[J]. *Journal of Insect Physiology*, 1996, 42(7): 669-679.
- [6] HOMMA T, WATANABE K, TSURUMARU S, et al. G protein-coupled receptor for diapause hormone, an inducer of *Bombyx* embryonic diapause[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 344(1): 386-393.
- [7] CHINO H. Carbohydrate metabolism in the diapause egg of the silkworm, *Bombyx mori*: II: Conversion of glyco-

- gen into sorbitol and glycerol during diapause[J]. *Journal of Insect Physiology*, 1958, 2(1): 1-12.
- [8] KAGEYAMA T, OHNISHI E. Carbohydrate metabolism in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*: I: Absence of phosphofructokinase in the diapausing egg[J]. *Development Growth Differentiation*, 1971, 13(2): 97-106.
- [9] HORIE Y, KANDA T, MOCHIDA Y. Sorbitol as an arrestor of embryonic development in diapausing eggs of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Insect Physiology*, 2000, 46(6): 1009-1016.
- [10] WATANABEK. Studies on the voltinism of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Bull Sericult Exp Sta (Tokyo)*, 1924, 6: 411-455.
- [11] XU W H, SATO Y, IKEDA M, et al. Stage-dependent and temperature-controlled expression of the gene encoding the precursor protein of diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(8): 3804-3808.
- [12] DENLINGER D L, YOCUM G D, RINEHART J P. Hormonal control of diapause[M]//Comprehensive Molecular Insect Science. Amsterdam: Elsevier, 2005: 615-650.
- [13] ZHU J, CHEN Y, ZHAO Q, et al. Expression profile of several genes on ecdysteroidogenic pathway related to diapause in pupal stage of *Bombyx mori* bivoltine strain[J]. *Gene*, 2019, 707: 109-116.
- [14] KOSTAL V, DENLINGER D L. Dormancy and developmental arrest in invertebrates[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2011, 57(5): 537.
- [15] SAUNDERS D S. Dormancy, diapause, and the role of the circadian system in insect photoperiodism[J]. *Annual Review of Entomology*, 2020, 65: 373-389.
- [16] HAHN D A, DENLINGER D L. Energetics of insect diapause[J]. *Annual Review of Entomology*, 2011, 56(1): 103-121.
- [17] JIANG T, CHEN Y, TAN Z, et al. Expression analysis and functional identification of several genes related to diapause in *Bombyx mori*[J]. *Development Growth Differentiation*, 2019, 61(2): 150-157.
- [18] BURGGREN W. Epigenetic inheritance and its role in evolutionary biology: Re-evaluation and new perspectives[J]. *Biology*, 2016, 5(2): 24.
- [19] PEGORARO M, BAFNA A, DAVIES N J, et al. DNA methylation changes induced by long and short photoperiods in *Nasonia*[J]. *Genome Research*, 2016, 26(2): 203-210.
- [20] SATO A, SOKABE T, KASHIO M, et al. Embryonic thermosensitive TRPA1 determines transgenerational diapause phenotype of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(13): E1249-E1255.
- [21] HAHN D A, DENLINGER D L. Meeting the energetic demands of insect diapause: Nutrient storage and utilization[J]. *Insect Physiology*, 2007, 53(8): 760-773.
- [22] JABLONKA E, RAZ G. Transgenerational epigenetic inheritance: Prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution[J]. *Quarterly Review of Biology*, 2009, 84(2): 131-176.
- [23] BONASIO R. The expanding epigenetic landscape of non-model organisms[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2015, 218(Pt 1): 114-122.
- [24] 陈玮, 徐雪娇, 陈楠菁, 等. 昆虫 DNA 甲基化的研究进展. *应用昆虫学报*[J], 2015, 52(5): 1082-1093.
- [25] CZERMIN B, SCHOTTA G, HÜLSMANN B B, et al. Physical and functional association of SU(VAR)₃-9 and HDAC1 in *Drosophila*[J]. *EMBO Reports*, 2001, 2(10): 915-919.
- [26] EGI Y, TSUBOUCHI H, SAKAMOTO K. Does DNA methylation play a role in photoperiodic diapause of moths?[J] *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2016, 4(4): 458-460.
- [27] JONES J D, O' CONNOR C D. Protein acetylation in prokaryotes[J]. *Proteomics*, 2011, 11(15): 3012-3022.
- [28] REYNOLDS J A, HAND S C. Embryonic diapause highlighted by differential expression of mRNAs for ecdysteroidogenesis, transcription and lipid sparing in the cricket *Allonemobius socius*[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2009, 212(Pt 13): 2075-2084.
- [29] NANDI D, TAHILIANI P, KUMAR A, et al. The ubiquitin-proteasome system[J]. *Journal of Bioscience*, 2006, 31(1): 137-155.
- [30] VAN WIJK S J, FULDA S, DIKIC I, et al. Visualizing ubiquitination in mammalian cells[J]. *EMBO Reports*, 2019, 20(2): e46520. doi: 10.15252/embr.201846520.
- [31] TIAN M, CHEN X, XIONG Q, et al. Phosphoproteomic analysis of protein phosphorylation networks in *Tetrahymena thermophila*, a model single-celled organism[J]. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2014, 13(2): 503-519.
- [32] GALVÁN-PEÑA S, CARROLL R G, NEWMAN C, et al. Malonylation of GAPDH is an inflammatory signal in macrophages[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 338.
- [33] WEINERT B T, SCHOLZ C, WAGNER S A, et al. Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation[J]. *Cell Reports*, 2013, 4(4): 842-851.
- [34] ZHANG Z, TAN M, XIE Z, et al. Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification[J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(1): 58-63.