

蛋白质组技术在昆虫抗药性机理研究中的应用

程 滨, 程罗根, 罗 勋 (1. 淮南师范学院化学生物系, 安徽淮南232001; 2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏南京210046)

摘要 主要介绍了蛋白质组学研究技术的主要途径及不同途径存在的问题、研究意义和利用该技术的研究成果, 以及采用蛋白质组学技术研究杀虫剂作用下昆虫体内差异表达蛋白质的情况及意义, 最后对该项技术的应用前景作了展望。

关键词 蛋白质组学; 昆虫; 差异表达

中图分类号 S481+4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)21-09169-02

Application of the Proteomic Technique in the Study on the Insecticide Resistance Mechanism

CHENG Bin et al (Department of Chemistry and Biology, Huainan Teacher College, Huainan, Anhui 232001)

Abstract The prevalent technique route of the proteome research and drawback of different route, as well as its significance and main achievements were introduced. This technique was used to explore protein differential expression in response to pesticide, and its significance and research status were referred.

Finally, we made a prospective of the application of this technique.

Key words Proteome; Insect; Differential expression

在生物的生长、发育和各种生理乃至病理过程中, 基因组通常是稳定不变的, 而基因的表达和蛋白质的功能都会有所不同。目前, 筛选差异分子的方法, 一是从基因水平筛选差异表达基因; 二是从蛋白质水平筛选差异表达蛋白质。但是, 由于有些 DNA 或 RNA 的改变, 并不影响其编码的蛋白质, 且某些蛋白质被合成后需经“翻译后修饰”才表现其功能, 所以从蛋白质水平寻找差异分子更准确更直接。

1 蛋白质组学技术的研究进展

蛋白质组(Proteome)是指基因组所表达的全套蛋白质^[1-2]。蛋白质组学的研究主要有2条途径: 一条途径是力图“查清”生物基因组编码的所有蛋白质, 建立蛋白质组学数据库^[3-5]。但是, 随着对蛋白质组学的深入理解和具体工作的开展, 人们逐渐认识到在短时间内建立一个生物体蛋白质组学“完整的”数据库和实现网络资源共享是难以实现的, 或者说条件尚未成熟。在没有弄清楚具体蛋白质的结构、功能、表达调控和亚细胞定位之前, 其应用前景也不是十分明确。另一条途径着重于寻找和筛选任何有意义的因素引起的2个样本之间的差异蛋白质谱, 从而揭示细胞生理和病理状态的进程与本质、对外界环境刺激的反应途径及细胞调控机制, 同时获得对某些关键蛋白的定性和功能分析^[6-7]。对于这种蛋白质组的特有组成及其改变的研究, 即差异蛋白质组研究, 是认识生命活动本质的一个恰当而直接的途径。比较、分析2种处于不同状态的细胞表达蛋白质的差异, 不仅有助于了解基因和蛋白质的功能, 还有可能分离出在特定生理状态下表达的特异蛋白, 从而在遗传毒理、抗逆性、抗药性分子机理、环境因素影响分析等方面具有重要的理论意义和实用价值^[8-10]。该领域的研究在国内外得到了广泛的应用并取得了很大的进展。Riccardi 等研究发现, 缺水应急除诱导玉米叶片的11种蛋白质的表达量增加了1.3~5.0个数量级外, 还获得了8种特异表达的蛋白质, 其中既包括已知的与缺水应急有关的蛋白, 也含有一些与代谢和木质化有关的酶^[11]; Peng 等用磷酸胺除草剂(Phosphoric amide herbicide

APM)处理小麦种子, 诱导产生了12种新的蛋白质^[12]; 范国强等对毛泡桐和白花泡桐同龄、同方位的病株健叶、病株病叶和健株健叶蛋白质双向电泳, 结果表明, 在2种泡桐健株健叶和病株健叶中存在的一种等电点为6.8、分子量为24 kD的蛋白多肽在病株病叶中观察不到, 因此这种蛋白可能与泡桐丛枝病有一定的关系^[13]; 谢玲等采用2-D PAGE 及质谱技术对⁶⁰Co 粒子照射诱发人支气管上皮恶性转化细胞的不同阶段蛋白组分进行了比较与鉴定后发现, 分子量为38.58 kD、等电点为6.64的蛋白质 ANX1-human 参与了支气管上皮细胞恶性转化过程, 与细胞恶性转化相关^[14]; Petricoin 等从卵巢癌病人的血清中筛选出5个标志蛋白^[15]; Aderson 等对用 actinomycin D 处理细胞核仁蛋白质差异分析发现了11种蛋白质缺失^[16]; 赵锐等研究表明, 正常兔脑与注射金属铅的兔脑在水溶性蛋白质的表达上具有显著差异^[17]; 王新等用巴豆提取物灌胃制备小鼠慢性胃肠运动增强模型, 提取其小肠组织中总蛋白质, 运用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳技术展示出模型动物小肠组织中有差异蛋白质的表达^[18]; 章波等采用射线9 Gy 全身照射 BALB/c 小鼠, 采用双向电泳技术初步鉴定出一些与代谢、过氧化应急、信号转导相关的蛋白质^[19]; Sun 等分析了蜕皮激素对苹果蠹蛾(Cydia pomonella L.) 卵巢特异蛋白的诱导作用^[20]; 黄定德等对⁶⁰Co 射线体外诱发的白血病小鼠胸腺细胞中蛋白酪氨酸磷酸酶(SHP2)的研究结果表明, 癌变组 SHP2 蛋白的表达、酪氨酸磷酸化水平及酶催化活性均明显高于对照组及未癌变组($P<0.01$)^[21]。

2 蛋白质组学技术在杀虫剂中的应用

杀虫剂对害虫的作用, 一方面是杀死害虫; 另一方面是使害虫产生越来越强的抗药性, 从而给害虫防治工作带来很大的困难。杀虫剂对昆虫的中毒作用, 在药物动力学上包括3种不同的层次: 穿透表皮组织、在体内组织中的分布、储存和代谢以及对靶标的作用。因此, 已公认的抗药性机理包括对杀虫剂暴露的减少、对杀虫剂解毒代谢的增强和靶标敏感性的降低。抗药性的产生和不断增强是一个非常复杂的过程, 除了与抗药性相关的基因作用之外, 还可能受到个体遗传背景、药剂类型、施药方式、环境等因素的影响, 因此, 从基因水平或生理生化水平研究抗药性机制均受到一定的局限。但是, 昆虫的抗药性显然是在杀虫剂作用下自身的生理生化

基金项目 安徽省教育厅自然科学基金项目(kj2008A137)。
作者简介 程 滨(1965-), 男, 安徽淮南人, 副教授, 从事植物保护的
教学和研究。
收稿日期 2008-05-12

改变所引起的,归根结底是体内蛋白质差异表达的结果。因此,分析在杀虫剂作用下昆虫体内蛋白质表达的差异,不仅有利于阐明杀虫剂的作用机理和抗药性发生机制,还有可能分离、鉴定出与抗性相关的蛋白质,从而为抗性治理和新型高效杀虫剂的开发提供理论基础。该领域的研究也取得了可喜进展。赵瑞君等分析了抗性家蝇蛹期多肽的变化,发现杀虫剂能使抗性家蝇体内的多肽发生质和量的改变^[22]。程罗根等^[23]对比研究了溴氰菊酯抗性品系、杀螟丹抗性品系、杀虫双抗性品系和敏感品系小菜蛾成虫的蛋白质在表达上的差异,结果表明杀虫剂的选择作用使小菜蛾体内蛋白质的表达发生了变化^[23]。

3 蛋白质组学技术的应用前景

虽然从蛋白质组的角度分析昆虫抗性机理的研究刚刚起步,但是可以预见,随着双向电泳技术和质谱技术的结合与进一步完善以及蛋白质数据库的不断丰富与更新,对抗性群体和敏感群体中表达蛋白质的分析,可以明确差异表达蛋白质的归属、性质和功能,筛选与药物抗性相关的蛋白质,了解抗性相关基因对整个基因组以及生物进化可能产生的影响,为合理有效地开展抗药性防治和新型杀虫剂的研发提供研究基础。

参考文献

[1] WILKINS M.Governments backs proteome proposal[J].Nature,1995,378:653.
[2] JUR R,MATHIAS M.What does it mean to identify a protein in proteomics?[J].Trends in Biochemical Sciences,2002,27(2):74.
[3] CHEVALLET M,SANTONI V,PONAS A,et al.New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis[J].Electrophoresis,1998,19:1901-1909.
[4] ROEPSTORFF P.Mass spectrometry in protein studies from genome to function[J].Curr Opin in Biotechnol,1997,8:6-13.
[5] GRIFFINT J,GOODLETT D R,AEBERSOLD R.Advances in proteome analysis by mass spectrometry[J].Curr Opin Biotechnol,2001,12(6):607.
[6] MANN M,HENDRICKSON R C,PANDEY A.Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry[J].Annu Rev Biochem,2001,70:437.
[7] PANDEY A,MANN M.Proteomics to study genes and genomes[J].Nature,

2000,405:837.

[8] CORBETT J M,DUNN M J,POSCH A,et al.Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilized pH gradient isoelectric focusing in the first dimension:An interlaboratory comparison[J].Electrophoresis,1994,15:1205.
[9] FERNANDEZ J,GHARAHDAIGH F,MISCHE S M.Routine identification of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS PAGE) gels or polyvinylidene difluoride membranes using matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry(MALDI-TOF MS)[J].Electrophoresis,1998,19:1036.
[10] CHEN P,XIE J Y,LIANG S P.Identification of protein spots in silver-stained two-dimensional gels by MALDI-TOF mass peptide map analysis[J].Acta Biochim Biophys Sin,2000,2:387.
[11] FREDERIQUE RICCARDI,PASCALE GAZEAU,DOMINIQUE DE VIENNE,et al.Protein changes in response to progressive water deficit in maize[J].Plant Physiol,1998,117:1253.
[12] PENG Y K,WANG Z Y,CHENG L G,et al.Effect of phosphoric amide herbicide APM on the structure and protein composition of chromosome in *Triticum durum*[J].Plant Prod Sci,2003,6(2):134.
[13] 范国强,李有,郑建伟,等.泡桐丛枝病发生相关蛋白质的电泳分析[J].林业科学,2003,39(2):119.
[14] 谢玲,应万涛,张开泰,等.双向电泳和肽质量指纹谱技术鉴定支气管上皮细胞恶性转化相关蛋白质 ANX1-human[J].中国生物化学与分子生物学报,2000,16(5):569.
[15] PETRICCONE,ARDEKANI A M,HTTB A,et al.Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer[J].The Lancet,2002,359:572.
[16] ANDERSEN J S,LYON C E,FOX A H,et alDirected proteomic analysis of the human nucleus[J].Curr Biol,2002,1:1.
[17] 赵锐,纪建国,郝守进,等.正常与重金属铅注射的兔脑蛋白质双向电泳图谱比较与鉴定[J].生物化学与生物物理进展,2001,28(6):874.
[18] 王新,张宗友,时永全,等.巴豆提取物诱导小鼠小肠组织中蛋白质差异表达的初步研究[J].胃肠病学和肝病学杂志,2000,9(2):103.
[19] 章波,栗永萍,刘晓宏,等.小鼠小肠上皮细胞经射线照射后蛋白质组差异分析[J].中华放射医学与防护杂志,2003,23(4):234.
[20] SUN X,SONG Q,BARRETT B.Effects of ecdysonic agonists on the expression of EcR,USP and other specific proteins in the ovaries of coding moth(*Cydia pomonella* L.)[J].Insect Biochemistry and Molecular Biology,2003,33:829.
[21] 黄定德,陈杞,韩玲,等.射线诱发的白血病小鼠胸腺细胞中SHP2表达及功能的研究[J].第三军医大学学报,2004,26(14):1258.
[22] 赵瑞君,李国锦,殷国荣,等.抗性家蝇蛹期多肽的双向电泳分析[J].中国媒介生物学及控制杂志,1997,8(2):108.
[23] 程罗根,许勤,于光,等.杀虫剂的选择作用对小菜蛾表达蛋白质的影响[J].南京师范大学学报:自然科学版,2006,29(4):101-104.

(上接第9168页)

[18] DOIRAY P A.Effect of acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors on root cell transmembrane electric potentials in grassicide-tolerant and susceptible corn (*Zea mays*) [J].Plant Physiology,1993,103(3):919-924.
[19] GUTIERI MJ.DNA sequence variation in domain A of the acetolactate synthase genes of herbicide-resistant and susceptible weed biotypes[J].Weed Science,1992,40(4):670-676.
[20] HALL L M,DEVINE M D.Gross-resistance of a chlorosulfuron-resistant biotype of *Stellaria media* to a triazopyridine herbicide[J].Plant Physiology,1990,93(3):962-966.
[21] HART S E,SAUNDERS J W,PENNER D.Chlorosulfuron-resistant sugarbeet: Gross resistance and physiological basis of resistance[J].Weed Science,1992,40(3):278-383.
[22] SAARI L L,COTTERMAN J C,PRIMAN M M.Mechanism of sulfonylurea herbicide resistance in the broadleaf weed *Kochia scoparia* [J].Plant Physiology,1990,93(1):55-59.
[23] DE PRADO,RAFAEL A,FRANCO A TON C R.Gross resistance and herbicide metabolism in grass weeds in Europe: Biochemical and physiological aspects [J].Weed Science,2004,52:441-447.
[24] MAZUR B J.Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, The target enzyme for two classes of herbicides [J].Plant Physiology,1987,85(4):1110-1117.
[25] STEVENS,SEEFELDT.Inheritance of dicofop resistance in wild oat (*Avena fatua* L.) biotypes from the Willamette valley of Oregon [J].Weed Science,1998,46:170-175.
[26] TUCKER E S,POWLESS B A biotype of hare barley (*Hordeum leporinum*) resistant to paraquat and diquat [J].Weed Science,1991,39(2):159-162.
[27] 马晓渊.抗药性杂草种群的发展及其理论对策[J].杂草科学,1994

(4):1-4.

[28] PUTWAIN P D,COLLINHA.Mechanism involved in the evolution of herbicide resistance in weeds [M].England:Cambridge University Press,1998:24.
[29] CASELEY J C,GUSSANS G W,ATKIN R K.Herbicide resistance in weeds and crops [M].Burrerworth Heinemann LTD,1991.
[30] 苏少泉.杂草学 [M].北京:中国农业出版社,1993:238-248.
[31] STEPHEN B P,DALE L S.Herbicide resistance and world grains [M].USA: CRC Press LLC,2001:28-31.
[32] CHRISTOPHY DELYE D.PCR based detection of resistance to acetyl-coA carboxylase-inhibiting herbicides in black grass and ryegrass [J].Pest Management Science,2002,(58):474-478.
[33] 姚建仁,唐建辉.杂草抗药性机制的研究[J].世界农业,1991(10):32-34.
[34] 王宁源,张玉娥.杂草抗药性与化学防除[J].雁北师范学院学报,2001,22(3):52-53.
[35] 钱希.杂草抗药性研究的进展[J].生态学杂志,1997,6(3):58-62.
[36] MOSS S R,RUBLIN B.Herbicide resistance weeds: A worldwide perspective [J].Journal of Agricultural Science,1993,120:141-148.
[37] 黄春艳.杂草抗药性研究概况[J].黑龙江农业科学,1997(6):45-47.
[38] STEPHEN MOSS I C.Glutathione transferases in herbicide-resistant and herbicide-susceptible black grass [J].Pest Science,1997,51:244-250.
[39] READ JOHN P H.New quick tests for herbicide resistance in black grass based on increased GST activity and abundance [J].Pest Management Science,2001,58:26-32.
[40] KUK YONG IN,WU J R,DEER J F.Mechanism of fenoxaprop resistance in an accession of smooth crabgrass (*Digitaria ischaemum*) [J].Pesticide Biochemistry & Physiology,1999,64(2):112-123.
[41] 赵善欢.植物化学保护 [M].北京:中国农业出版社,2000:266.