Journal of Southwest University (Natural Science Edition)

DOI: 10.13718/j. cnki. xdzk. 2024. 12. 011

赵东超,刘丽婧,赵莉,等.基于超高分辨质谱的家蚕脂肪体样品处理方案优化研究 [J].西南大学学报(自然科学版), 2024,46(12):109-116.

# 基于超高分辨质谱的 家蚕脂肪体样品处理方案优化研究

赵东超<sup>1</sup>, 刘丽婧<sup>2</sup>, 赵莉<sup>3</sup>, 张艳<sup>1</sup>, 董照明<sup>1</sup>, 夏庆友<sup>1</sup>, 赵萍<sup>1</sup>

1. 西南大学 西部 (重庆)科学城种质创制大科学中心/前沿交叉学科研究院生物学研究中心,重庆 400715;

2. 重庆市中药研究院 中药创新药物与健康干预重庆市重点实验室, 重庆 400065;

3. 兰州大学 生态学院, 兰州 730000

摘要:随着家蚕基因组图谱的发布,家蚕的研究逐渐进入后基因组时代,家蚕蛋白质组样品前处理方法没有统一的标准,鉴定到的蛋白质数量差异较大.基于超高分辨率质谱仪,建立冰上组织研磨器研磨提取蛋白质的方法,能极大地避免材料的损失,具有稳定和快速的优点.通过对不同提取试剂的摸索,发现尿素+DTT 对家蚕组织样品的提取效果最好.通过对上样量和上样时间的摸索,确定最佳上样量为10 μL,最佳上样时间为120 min. 利用90%序列相似性原则构建非冗余家蚕数据库 Strealine,在家蚕5 龄第3 d 脂肪体材料中,使用该库能鉴定到1910 种蛋白质.进一步采用反相色谱柱对肽段进行分级,将鉴定到的蛋白数量提升至3986 种.

关 键 词:家蚕;蛋白质组;脂肪体;蛋白质数量;肽段分级

中图分类号: Q51; O657.63 文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2024)12-0109-08

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



**Optimization Study of Silkworm Fat Body Sample Processing Scheme Based on Ultra-High Resolution Mass Spectrometry** 

ZHAO Dongchao<sup>1</sup>, LIU Lijing<sup>2</sup>, ZHAO Li<sup>3</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>, DONG Zhaoming<sup>1</sup>, XIA Qingyou<sup>1</sup>, ZHAO Ping<sup>1</sup>

1. Integrative Science Center of Germplasm Creation in Western China (Chongqing) Science City, Southwest University/ Biological Science Research Center of Academy for Advanced Interdisciplinary Studies, Chongqing 400715, China;

2. Chongqing Key Laboratory of Innovative Traditional Chinese Medicine and Health Intervention, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China;

3. College of Ecology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

收稿日期: 2023-08-25

基金项目:国家重点研发计划项目(2022YFD1201600);国家自然科学基金项目(32030103);西南大学实验技术研究项目(SYJ2024022).

作者简介:赵东超,实验师,主要从事家蚕蛋白质组研究.

通信作者:赵萍,教授,博士研究生导师.

Abstract: With the release of the silkworm genome map, research on silkworm has gradually entered the post-genomic era. There is no uniform standard for sample-pretreatment methods for silkworm proteome samples, and the number of proteins can be identified varies greatly. This study presents a novel method for protein extraction using a tissue grinder on ice. The proposed extraction method effectively minimizes material loss and offers improved stability and speed compared to traditional methods. After exploring different extraction reagents, it was found that urea with DTT has the best extraction effect on silkworm tissue samples. By exploring loading volumes and loading times, it was determined that the optimal loading volume was 10  $\mu$ L and the optimal loading time was 120 min. Using the principle of 90% sequence similarity, a non-redundant silkworm database Strealine was constructed. Using this database, 1 910 proteins can be identified in the fat body material of silkworm on the third day of fifth instar. Reversed-phase chromatography columns were further used for peptide fractionation, the number of identified proteins increased to 3 986.

Key words: silkworm (Bombyx mori); proteome; fat body; number of proteins; peptide fractionation

家蚕(Bombyx mori)是一种重要的经济昆虫,蛋白质是生命的物质基础,对家蚕蛋白质组的研究不仅 能发现许多以前未报道过的蛋白,还能解释家蚕的各项生命活动.对新鉴定蛋白的功能进行研究,对改造 家蚕品种、遗传育种等方面都具有重要意义. 随着质谱仪分辨率的不断提高和对家蚕研究的不断深入, 人 们更想知道家蚕整个生命周期各个组织中的蛋白表达情况,而目前家蚕还没有一份高覆盖率的精细蛋白质 · 谱图.要想获得高覆盖率的精细谱图,除了要采用先进的超高分辨率质谱仪外,还应该对样品质谱前处理 的方法步骤进行改良.在 2014年, Nature 连载了 2 篇人类蛋白质组研究成果<sup>[1-2]</sup>, 使研究者对人类编码蛋 白有了清晰的认识,对物种蛋白质组的全谱鉴定能为相关物种的研究打下良好的基础.随着家蚕基因组研 究的不断深入[3-8],家蚕的研究也进入了后基因组时代,而蛋白质组是后基因组时代的一个重要内容.钟伯 雄<sup>[9]</sup>采用双向电泳及蛋白质氨基酸序列分析技术,研究了家蚕不同胚胎发育时期的基因表达情况. 徐豫松 等100应用双向电泳、同位素标记等方法研究了家蚕5龄期和变态期的脂肪体,从5龄蚕检测到270种蛋白 质到 5 龄 96 h 检测到 400 多种蛋白质,为了解脂肪体蛋白质的表达规律奠定了基础. 2009 年, Li 等<sup>[11]</sup>首 次采用鸟枪法 LC-MS/MS 整合生物信息学方法研究了家蚕 5 龄第 5 d 内分泌系统的脑、神经节和胸腺 3 个 器官,分别鉴定出3430,2683和3395种蛋白.之后,有学者研究了家蚕的头<sup>[12]</sup>、胚胎<sup>[13]</sup>、脂肪体<sup>[14]</sup>等 组织器官的蛋白质组,甚至对之前双向电泳没研究过的组织,如触角<sup>[15]</sup>、附腺<sup>[16]</sup>、蜕皮液<sup>[17]</sup>等都做了蛋白 质组研究.利用不同组织样品不同处理方式的蛋白质组数据,有学者对家蚕蛋白质库进行了优化与整 合<sup>[18]</sup>,也使得家蚕的比较蛋白质组学慢慢成熟,基于高分辨率质谱仪家蚕蛋白质组全谱鉴定呼之欲出.蛋 白质组常用的样品处理方法是过滤器辅助旋转方法(FASP)<sup>[19]</sup>,该方法可以有效去除制备样品过程中造成 的污染.基于此法的改进方案也有很多[20],有学者通过分级样品来增加蛋白质的鉴定数量[21-24],也有学者 通过改良数据算法来增加蛋白质的鉴定数量<sup>[25-27]</sup>,还有学者通过去除高丰度蛋白来提升鉴定效果<sup>[28]</sup>.这些 改良方法主要是用人类细胞系或者容易获取且稳定的材料做实验,目前还没有在蚕的组织器官或蚕的细胞 系开发蛋白质组技术的报道. 如果想采用超高分辨率质谱仪绘制家蚕高覆盖率的蛋白质精细谱图, 就需要 优化各项参数,系统评估家蚕蛋白质组样品的特殊性.本研究基于超高分辨率质谱仪,使用家蚕脂肪体改 良质谱前处理方法、优化质谱上机参数、优化数据库和分级策略等方式来提高鉴定蛋白质的数量,旨在为 大规模蛋白质组测序奠定基础.

# 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验中所使用的家蚕脂肪体取自'大造',该品种由西南大学前沿交叉学科研究院生物学研究中心基

因库提供. 幼虫在室温条件下喂食新鲜桑叶,待蚕生长至5龄第3d,用镊子夹出脂肪体置于装双蒸水的 一次性培养皿中,用滤纸吸干水分后放于1.5 mL离心管中,每支离心管大约装400 μL,-80 ℃冰箱中 保存备用.

#### 1.2 液氮研磨与组织研磨器研磨的比较

取出两管脂肪体样品,一管倒入预冷的研钵中,加入液氮进行研磨;研磨后转移到新的离心管中,加入约 400 µL 8 mol/L 尿素(Sigma, 51456)溶液.另一管加入 400 µL 8 mol/L 尿素后用组织研磨器(生工,F520001-0001)在冰上研磨.水平震荡器(Tomy, MT-360)第 9 档振荡 5 min; 11 500 r/min, 25 ℃离心 15 min,取上清置于新的离心管中;之后用 BCA 蛋白质定量试剂盒(Sigma, QPBCA)对样品进行蛋白浓度定量.

#### 1.3 质谱前处理步骤

质谱前处理步骤参考 FASP 酶解步骤<sup>[19]</sup>,将 200 μg 样品加入 10 kDa 超滤管(Millipore, UFC5010BK) 中,使用 8 mol/L 尿素溶液补足 200 μL,混匀后 11 500 r/min 室温离心 20 min;加入 200 μL 8 mol/L 尿素,11 500 r/min 室温离心 20 min;再用 8 mol/L 尿素洗 2 次(超滤管管底溶液快满时,将溶液倒 出);加入 1 mol/L 二硫苏糖醇(Sigma, D9163)溶液(DTT) 50 μL, 150 μL 8 mol/L 尿素溶液,管口用 封口膜(Bemis, PM-996)密封置于 37 ℃孵育 2 h;撕开封口膜,加入 15 μL 1 mol/L 碘乙酰胺(Sigma, I1149)溶液,混匀后,室温避光孵育 1 h, 11 500 r/min 室温离心 20 min;加入 200 μL 8 mol/L 尿素溶 液,11 500 r/min 室温离心 20 min洗 2 次;加入 200 μL 50 mmol/L 碳酸氢铵(Sigma, 40867)溶液, 11 500 r/min 室温离心 20 min洗 3 次;将超滤管底座换新,在超滤管中加入 400 μL 10 μg/mL 胰蛋白 酶(Sigma, T6567)溶液,管口用封口膜密封,37 ℃孵育 36 h;撕掉封口膜,11 500 r/min 室温离心 20 min;在超滤管中加入 40 μL 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液,室温 11 500 r/min 离心 20 min,4 ℃冷冻 浓缩至样品完全干燥;用脱盐柱(Thermo Fisher Scientific, 87784)脱盐,然后在4 ℃浓缩干燥;向脱 盐后冻干的肽段加入 100 μL 0.1%甲酸水(Thermo Fisher Scientific, 85170)溶液,振荡 30 s,室温 11 500 r/min离心 10 min,吸上清 10 μL 于上样瓶中.

#### 1.4 质谱检测

色谱部分:采用 Thermo Fisher Scientific 的 EASY-nLC 1000 纳升级流速系统进行样品上样,采用预 柱(Thermo Fisher Scientific, 164564)串联分析柱(Thermo Fisher Scientific, 164555)分离肽段. A 相为 0.1%甲酸水溶液,B相为 0.1%甲酸乙腈(Thermo Fisher Scientific, 85174)溶液,上样环吸取 2  $\mu$ L 样品溶 液,吸样流速为 8  $\mu$ L/min,使用 16  $\mu$ L A 相溶液用 3.5  $\mu$ L/min 的流速推入分析柱中,检测时用梯度乙腈 溶液进行检测,流速为 0.25  $\mu$ L/min,上样时间为 60 min. 平衡预柱的体积为 10  $\mu$ L,流速为 3.5  $\mu$ L/min; 平衡分析柱的体积为 5  $\mu$ L,流速为 0.25  $\mu$ L/min,用 100  $\mu$ L B 相清洗自动上样环.

质谱部分:采用 Thermo Fisher Scientific 公司 Q Exactive 质谱仪,检测时间为 60 min,喷雾电压为 2.3 kV,离子传输管温度为 275 ℃.离子模式为正离子模式,默认电荷为 2 个,全扫的分辨率为 70 000, AGC target 为 1e6, Maximum IT 为 20 ms,扫描范围为 300~1 800 m/z; 二级扫描分辨率为 17 500, AGC target 为 1e5, Maximum IT 为 60 ms,采用 Top 20 原则采集数据,动态排除时间设置为 30 s.质谱环境温度为 22 ℃,空气湿度为 50%.

#### 1.5 质谱数据匹配

原始数据采用 MaxQuant 1.3.0.5 搜库,数据库为 2016 年 7 月从 NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov) 下载的数据和从 SilkDB(http://silkworm.swu.edu.cn/silkdb)下载的共 32 835 条家蚕蛋白质序列的 数据库.可变修饰选择 Oxidation(M)和 Acetyl(Protein N-term),酶切位点选择 Trypsin/P,最大漏切 位点 2 个,最大带电荷 7, Protein FDR 为 0.01,最小肽段长度为 6.得到的数据去除污染序列数据和 反向序列数据后用于分析.

#### 1.6 不同上样时间与不同上样体积对质谱鉴定蛋白质数量的影响

将 1.2 和 1.3 中组织研磨方法制备的肽段全部加入上样瓶中,分别用不同的上样时间和不同的上样 体积进行质谱检测. ① 上样时间分别为 60,90,120,150,180,240 min,上样体积为 2 μL; ② 上样体 积分别为 1,2,4,6,8,10,12,14,16,18 μL,上样时间为 90 min. LC-MS/MS、数据匹配等其他参数 如 1.4 和 1.5 所述.

#### 1.7 不同提取试剂对质谱鉴定蛋白质数量的影响

样品制备:取4管5龄第3d脂肪体样品,分别加入8mol/L尿素溶液、4%SDS溶液、8mol/L尿素 100mmol/LDTT溶液、4%SDS100mmol/LDTT溶液,之后采用2D蛋白定量试剂盒(GEHealthcare, 80-6483-56)进行蛋白质定量,再经FASP酶解后质谱检测,详细步骤如1.3-1.6所述.

#### 1.8 家蚕数据库的优化

样品制备:取5龄第3d脂肪体样品,加入8mol/L尿素溶液溶解样品,FASP酶解后采用90min上 样时间和10μL上样量进行质谱检测,获得6次技术重复数据,详细步骤如1.3-1.5所述.

从网址 KAIKObase: http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase,Uniprot: http://silkworm.genomics.org.cn,NCBI: http://www.ncbi.nlm.nih.gov,SilkDB: http://silkworm.genomics.org.cn,Silkbase: http://silkbase.ab.a.u-tokyo.ac.jp 中下载最新的家蚕蛋白质序列,将二代数据库进行整合得到 Merge 库.序列相似性阈值设置为90%,得到非冗余数据库 Streamine 库,该库含有21878 种家蚕蛋白质. 采用不同的数据库分别搜索,其他质谱数据匹配参数如1.3-1.5 所述.

#### 1.9 反相色谱柱分级

按照 1.3 中的方法将 400 μg 脂肪体样品酶解成肽段,按照高 pH 反相色谱柱(Thermo Fisher Scientific, 84868)说明书对肽段进行分级,之后采用上述摸索好的各项条件进行质谱检测后采用 Streamine 库进 行数据匹配.

# 2 结果与分析

#### 2.1 液氮研磨与组织研磨器研磨的比较

通过比较液氮提取与组织研磨器提取鉴定到的蛋白质数量(图 1),可以发现 2 种研磨方式鉴定到约 90%的蛋白质都一样(1 377 种),仅有小部分不同.组织研磨器提取(166 种)比传统液氮提取(133 种)鉴定 到的蛋白质个数多 33 种.

## 2.2 不同提取试剂对质谱鉴定蛋白质数量的影响

通过对 4 种常见的蛋白质提取溶液进行比较可以看出(图 2),尿素+DTT 溶液鉴定到的蛋白质数量最 多,共鉴定到 1 811 种蛋白质.尿素鉴定到的蛋白质数量最少,为 1 696 种.通过该实验可以看出,SDS 溶 液和尿素溶液的提取方法都能鉴定到绝大多数相同的蛋白质(1 334 种),不同的提取试剂又能提取到一些 特有的蛋白质.通过不同试剂间的比较,最多有 115 种蛋白质的提升.



#### 2.3 不同上样体积和不同上样时间对蛋白质数量的影响

通过比较不同上样体积鉴定到的蛋白质数量,可以看出当上样体积达到 10 μL 时,鉴定到的蛋白质 数量不再明显增加(图 3a). 肽段上样量在 4 μL 以上时,蛋白质的中位数丰度(iBAQ)趋于稳定(图 3b), 蛋白质丰度跟检测响应的信号值相关,因此 10 μL 的上样量是最佳上样量. 对于家蚕样品,最佳上样时 间为 120 min(图 3c),而此时蛋白度的丰度值也相差不大(图 3d). 通过不同上样体积的比较,可以提升 322 种蛋白质. 通过不同上样时间的比较,可以提升 224 种蛋白质.



图 3 上样体积和上样时间对鉴定蛋白质数量的影响

#### 2.4 家蚕数据库的比较与优化

通过用家蚕二代数据库 KAIObase, SilkDB, NCBI, Uniprot 搜同样的一组家蚕脂肪体质谱原始数据,分别鉴定到1766,1824,1858,1878种蛋白.4个家蚕二代数据库的鉴定效果差别不大,平均鉴定数量为1832种,将4个库整合后的 Merge 数据库鉴定到1901种,非冗余数据库 Streamline 鉴定到1910种(图4).

#### 2.5 反相色谱柱分级肽段提升蛋白质数量

采用反相色谱柱分级肽段的方法对酶解肽段进行分级后,经质谱检测,家蚕脂肪体最多可以鉴定到 3 986 种蛋白质(图 5).



# 3 讨论与结论

## 3.1 讨论

114

本研究通过对研磨方法、提取试剂、上样体积、上样时间、数据库、分级方法等条件进行实验,发现很 多条件都能影响蛋白质的鉴定数量.

比较液氮研磨和组织研磨器研磨,发现两种研磨方式鉴定到的蛋白质数量接近.在一些组织或器官比较小的样品可以使用组织研磨器提取,该种方法能有效避免蛋白在提取过程中的损失,让质谱鉴定到更多的蛋白质.液氮研磨需要对研钵和研棒进行清洗、高温消毒等,在进行研磨时需要使用大量的液氮进行降温,不仅浪费液氮,而且还有可能造成样品污染等问题.组织研磨器研磨样品只需在离心管中进行,研磨样品也只需 5 min 左右.综上所述,组织研磨器研磨样品,具有稳定和快速等优点.

样品提取方式多种多样,蛋白质种类繁多,不同的试剂提取蛋白质的效率也不一样,目前没有一种能 提取所有蛋白质并用于质谱检测的溶液.尿素和 SDS 都能使蛋白质变性而溶解在溶液中,但是哪种溶液更 好目前还没有一个准确的依据.DTT 加入可还原二硫键,能使蛋白质更好地溶解在溶液中.通过比较不同 的提取溶液,可以看出尿素+DTT 这种组合方法鉴定的蛋白质数量最多.在不加 DTT 的情况下,SDS 的 提取效果要优于尿素,而在加 DTT 的情况下,尿素的效果要优于 SDS.在加入 DTT 后,无论是尿素还是 SDS 溶液,鉴定的蛋白质数量都比不加 DTT 多.通过提取溶液的摸索,使质谱鉴定数量增加了 115 种.

通过同一样品不同上样体积的摸索实验可以发现,质谱上样体积达到饱和时,即使再增加上样体积, 也不会显著影响鉴定的蛋白质数量.本研究确定了家蚕样品最佳上样量为 10 μL,从所鉴定蛋白质的丰度 来看,在 10 μL 检测的信号响应值也达到最大,通过上样体积的摸索能提升 322 种蛋白质.通过对同一样 品上样时间的探索,随着上样时间的逐渐增加,在 120 min 之后鉴定到的蛋白质数量几乎没有提升,因此 也可确定 120 min 为检测的最佳上样时间,该种方法能多鉴定到 224 种蛋白质.目前家蚕样品多采用 3 h 上样时间<sup>[29]</sup>,本方法每个样品能节约 1 h 检测时间.

在对不同数据库的比较中可以看出,家蚕数据库对鉴定蛋白质数量影响不大,家蚕二代基因组数据库 平均鉴定数量为1832种.如果简单地将库进行合并,搜库结果中会存在许多冗余数据,非常不利于结果 的详细分析.构建的非冗余数据库 Strealine,最多能鉴定到1910种蛋白质.值得一提的是,目前日本已经 利用第三代测序技术,重新构建了第三代家蚕基因组数据库 Silkbase<sup>[6]</sup>,该库中有16880种蛋白质序列, 共匹配到了1902种蛋白质,彰显出三代数据库的一定优势.

在利用肽段分级策略对样品分级后,可以显著提升鉴定的蛋白质数量,最多鉴定到了3986种蛋白质.

第12期

目前的家蚕脂肪体样品中,很少有文献能达到这种鉴定效果<sup>[14,29-34]</sup>,如果将来做家蚕大规模蛋白质组测序,使用该种分级策略能大大提高蛋白质的鉴定数量.

#### 3.2 结论

本研究通过优化蛋白质组质谱前处理中的样品研磨方式和样品提取溶液、优化质谱检测的上样量和检测上样时间、优化数据库和使用分级策略等参数,使家蚕脂肪体鉴定到的蛋白质数量最终提升至3986种. 解决了家蚕样品量少不易于蛋白质组检测、家蚕蛋白质组最佳上样时间、家蚕数据库冗余等问题,并通过 肽段分级策略大大提升了蛋白质的鉴定数量.建立了较为完善的家蚕蛋白质组检测平台,为大规模蛋白质 组测序奠定了基础.

#### 参考文献:

- KIM M S, PINTO S M, GETNET D, et al. A Draft Map of the Human Proteome [J]. Nature, 2014, 509(7502): 575-581.
- [2] WILHELM M, SCHLEGL J, HAHNE H, et al. Mass-Spectrometry-Based Draft of the Human Proteome [J]. Nature, 2014, 509(7502): 582-587.
- [3] XIA Q Y, ZHOU Z Y, LU C, et al. A Draft Sequence for the Genome of the Domesticated Silkworm (Bombyx mori) [J]. Science, 2004, 306(5703): 1937-1940.
- [4] INTERNATIONAL SILKWORM GENOME CONSORTIUM. The Genome of a Lepidopteran Model Insect, the Silkworm Bombyx mori [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 38(12): 1036-1045.
- [5] XIA Q Y, GUO Y R, ZHANG Z, et al. Complete Resequencing of 40 Genomes Reveals Domestication Events and Genes in Silkworm (Bombyx mori) [J]. Science, 2009, 326(5951): 433-436.
- [6] KIM S R, KWAK W, KIM H, et al. Genome Sequence of the Japanese Oak Silk Moth, Antheraea Yamamai: The First Draft Genome in the Family Saturniidae [J]. GigaScience, 2018, 7(1): 1-11.
- [7] 龚竞,张伟,唐苗,等.家蚕小分子热激蛋白 BmHsp19.1 基因克隆及在蚕卵中的表达特征 [J].西南大学学报(自然科学版),2023,45(6):109-115.
- [8] 张松斗,陈丽君,安世恒,等. 家蚕性信息素腺体肌质网膜 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶基因的分子鉴定 [J]. 河南农业大学学报, 2012,46(5):577-583.
- [9] 钟伯雄. 家蚕胚胎发育时期的蛋白质变化及构造分析 [J]. 遗传学报, 1999, 26(6): 627-633, 739.
- [10] 徐豫松,徐俊良,川崎秀树.家蚕脂肪体合成蛋白质变化的研究 [J].蚕业科学,2000,26(4):239-243.
- [11] LI J Y, CHEN X, FAN W, et al. Proteomic and Bioinformatic Analysis on Endocrine Organs of Domesticated Silkworm, *Bombyx mori* L. for a Comprehensive Understanding of Their Roles and Relations [J]. Journal of Proteome Research, 2009, 8(6): 2620-2632.
- [12] LI J Y, MOGHADDAM S H H, CHEN X, et al. Shotgun Strategy-Based Proteome Profiling Analysis on the Head of Silkworm Bombyx mori [J]. Amino Acids, 2010, 39(3): 751-761.
- [13] LI J Y, MOGHADDAM S H H, CHEN J E, et al. Shotgun Proteomic Analysis on the Embryos of Silkworm Bombyx mori at the End of Organogenesis [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 40(4): 293-302.
- [14] YANG H J, ZHOU Z H, ZHANG H R, et al. Shotgun Proteomic Analysis of the Fat Bodyduring Metamorphosis of Domesticated Silkworm (Bombyx mori) [J]. Amino Acids, 2010, 38(5): 1333-1342.
- [15] ZHAO Y P, LI H C, MIAO X X. Proteomic Analysis of Silkworm Antennae [J]. Journal of Chemical Ecology, 2015, 41(11): 1037-1042.
- [16] DONG Z M, WANG X H, ZHANG Y, et al. Proteome Profiling Reveals Tissue-Specific Protein Expression in Male and Female Accessory Glands of the Silkworm, *Bombyx mori* [J]. Amino Acids, 2016, 48(5): 1173-1183.
- [17] QU M B, MA L, CHEN P, et al. Proteomic Analysis of Insect Molting Fluid with a Focus on Enzymes Involved in Chitin Degradation [J]. Journal of Proteome Research, 2014, 13(6): 2931-2940.
- [18] ZHANG Y Z, XIA Q Y, XU J, et al. Aligning the Proteome and Genome of the Silkworm, Bombyx mori [J]. Func-

tional & Integrative Genomics, 2009, 9(4): 447-454.

- [19] WISNIEWSKI J R, ZOUGMAN A, NAGARAJ N, et al. Universal Sample Preparation Method for Proteome Analysis [J]. Nature Methods, 2009, 6(5): 359-362.
- [20] NI M W, WANG L, CHEN W, et al. Modified Filter-Aided Sample Preparation (FASP) Method Increases Peptide and Protein Identifications for Shotgun Proteomics [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2017, 31(2): 171-178.
- [21] GEIGER T, WEHNER A, SCHAAB C, et al. Comparative Proteomic Analysis of Eleven Common Cell Lines Reveals Ubiquitous but Varying Expression of Most Proteins [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2012, 11(3): M111. 014050.
- [22] FANG Y, ROBINSON D P, FOSTER L J. Quantitative Analysis of Proteome Coverage and Recovery Rates for Upstream Fractionation Methods in Proteomics [J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(4): 1902-1912.
- [23] FOURNIER M L, GILMORE J M, MARTIN-BROWN S A, et al. Multidimensional Separations-Based Shotgun Proteomics [J]. Chemical Reviews, 2007, 107(8): 3654-3686.
- [24] WANG H, CHANG-WONG T, TANG H Y, et al. Comparison of Extensive Protein Fractionation and Repetitive LC-MS/MS Analyses on Depth of Analysis for Complex Proteomes [J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(2): 1032-1040.
- [25] 吴松锋,朱云平,贺福初.人类蛋白质组表达谱蛋白质鉴定的分步搜索策略 [J].遗传,2005,27(5):687-693.
- [26] SCHAAB C, GEIGER T, STOEHR G, et al. Analysis of High Accuracy, Quantitative Proteomics Data in the MaxQB Database [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2012, 11(3): M111. 014068.
- [27] TYANOVA S, TEMU T, COX J. The MaxQuant Computational Platform for Mass Spectrometry-Based Shotgun Proteomics [J]. Nature Protocols, 2016, 11(12): 2301-2319.
- [28] ANDERSON N L, ANDERSON N G. The Human Plasma Proteome History, Character, and Diagnostic Prospects [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2002, 1(11): 845-867.
- [29] CHEN Q M, MA Z G, WANG X, et al. Comparative Proteomic Analysis of Silkworm Fat Body after Knocking out Fibroin Heavy Chain Gene: A Novel Insight into Cross-Talk between Tissues [J]. Functional & Integrative Genomics, 2015, 15(5): 611-637.
- [30] HOU Y, ZHAO P, LIU H L, et al. Proteomics Analysis of Fat Body from Silkworm (Bombyx mori) [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2007, 23(5): 867-872.
- [31] LI J, MOGHADDAM S H, DU X, et al. Comparative Analysis on the Expression of Inducible HSPS in the Silkworm, Bombyx mori [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(4): 3915-3923.
- [32] LIU X Y, CHEN K P, YAO Q, et al. Proteomic Analysis of Differentially Expressed Proteins Involved in BmNPV Resistance in the Fat Body of Silkworm, Bombyx mori [J]. Zeitschrift Fur Naturforschung C, Journal of Biosciences, 2010, 65(11-12): 713-718.
- [33] YAMASHITA M, XU J, MOROKUMA D, et al. Characterization of Recombinant Thermococcus kodakaraensis (KOD) DNA Polymerases Produced Using Silkworm-Baculovirus Expression Vector System [J]. Molecular Biotechnology, 2017, 59(6): 221-233.
- [34] SONG L, WANG F, DONG Z M, et al. Label-Free Quantitative Phosphoproteomic Profiling of Cellular Response Induced by an Insect Cytokine Paralytic Peptide [J]. Journal of Proteomics, 2017, 154: 49-58.

## 责任编辑 周仁惠