

# 褐飞虱卵黄蛋白的分离及其生化特性

戴华国, 衣维贤

(南京农业大学植物保护学院, 南京 210095)

摘要: 电泳结合不同染色方法证实, 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 卵黄蛋白为一种糖脂结合蛋白, 其分子量约为 314 kD, 由 148 kD、124.5 kD 和 39.6 kD 3 个亚基组成。免疫反应证明, 卵黄蛋白只存在于生育期的雌性褐飞虱成虫体内。褐飞虱卵黄蛋白具有种的特异性, 其免疫血清与白背飞虱的卵黄蛋白无交叉反应。

关键词: 褐飞虱; 卵黄蛋白; 性质; 免疫反应

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)01-0029-05

## Separation and characterization of vitellin of *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae)

DAI Hua-Guo, YI Wei-Xian (College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The vitellin of the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) was assayed using polyacrylamide gel electrophoresis and different dyeing methods. The results indicated that the vitellin is a kind of protein containing sugar and fat. The molecular weight of the vitellin was 314 kD, consisting of three subunits with molecular weight of 148 kD, 124.5 kD and 39.6 kD respectively. Immunity experiment showed that the vitellin only existed in reproductive period of female adults of *N. lugens*. The vitellin of *N. lugens* was species-specific, and not reactive with the vitellin of the white back planthopper (*Sogatella furcifera*).

**Key words:** *Nilaparvata lugens*; vitellin; properties; immunity reaction

研究卵黄蛋白(vitellin, Vt)的理化性质是深入研究昆虫卵黄发生及其调控的重要步骤。部分种类昆虫卵黄蛋白的研究方法已比较成熟, 其组成及含量的研究也比较透彻, 有关卵黄蛋白的摄取过程、激素调控机理的研究已达到一定水平, 但是, 所研究的昆虫主要集中在部分卫生昆虫、经济昆虫与蜘蛛等, 如蜚蠊(Dejmal and Brookes, 1972)、埃及伊蚊(Hagedorn and Judson, 1972)、家蝇(龚和李乾君, 1992)、天蚕(Kunkel and Pan, 1976)、叶恭银等(1998)、蓖麻蚕(Chino *et al.*, 1977)、家蚕(Ken and Okitusugu, 1983)、真水狼蛛(彭宇等, 2000)、飞蝗(Chen and Wyatt, 1978)和七星瓢虫(龚和等, 1982)等。作为我国乃至整个东南亚主要粮食作物水稻的重要害虫——褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 所属的同翅目昆虫, 国内外至今尚未见对其卵黄蛋白性质的相关报道。本文作者对褐飞虱的卵黄蛋白进行

了初步研究, 对其生化特性作了一些探讨, 以期为从生理学角度研究高温对褐飞虱种群消长的影响奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试虫源

褐飞虱由广西农业科学研究院植物保护研究所提供, 分别于2002年和2003年的4月采自广西南宁的水稻田。室外网室饲养, 自然繁殖。室内在室温  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , 相对湿度  $\geq 90\%$ , 光周期 16L:8D 的条件下, 以汕优 63 分蘖拔节期稻株饲养。

### 1.2 卵黄蛋白的提取和纯化

参照龚和等(1982)方法, 并加以改进。收集刚产下的褐飞虱卵, 用蒸馏水洗净, 滤纸吸干后称鲜重, Biofuge Straos 型冷冻离心机(德国 Heraeus 公司

生产 B 300 × g 4℃ 下离心 20 min 取上清液 ; 上清液在低温下用玻璃纤维迅速过滤除去脂层后 , 按 1:8 ~ 1:10 的比例加入预冷的重蒸水 , 4℃ 下静置过夜 , 使卵黄蛋白沉淀 ; 再于 850 × g , 4℃ 下离心 20 min , 弃上清液 ; 将所得的粗沉淀物溶于少量 0.4 mol/L NaCl 4℃ 下静置过夜 , 使卵黄蛋白再沉淀。如此反复 2 ~ 3 次后 , 将分离所得的卵黄蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 鉴定纯度 , 达到电泳级后 , 将得到的卵黄蛋白经 SNL216v 型真空冷冻干燥机 (美国 Savant 公司生产) 冷冻干燥 , -20℃ 密闭保存备用。

### 1.3 电泳

采用 Laemmli 系统。参照郭尧君和俞添 (1996) 及郭尧君 (2001) 的方法进行卵黄蛋白的 PAGE 分析 ; 参照李玉民 (1999) 方法进行卵黄蛋白的 SDS-PAGE 分析。测定卵黄蛋白的组成、分子量及亚基分子量。实验重复 3 次。

**1.3.1 样品制备 :** 将提取后经纯化的卵黄蛋白用预冷的酶提取液 (EDTA , 0.0292 g ; β-巯基乙醇 , 0.0391 mL ; 苯基硫脲 , 0.040 g ; 用 pH 7.0 的磷酸缓冲液定容至 100 mL) 配成 5 mg/mL 的供试样品混合液。PAGE 和 SDS-PAGE 加样前分别按样品混合液 : 样品缓冲液 = 4:1 比例 , 将供试样品与 5 倍样品缓冲液混合。后将混合液在沸水浴中加热 5 min , 取出冷至室温备用。

**1.3.2 电泳条件 :** PAGE 的凝胶浓度为 5% 和 7.5% , 缓冲体系为 pH 8.3 的 Tris-Gly (甘氨酸) 。SDS-PAGE 的凝胶浓度为 7.5% , 缓冲体系为 pH 8.3 的 Tris-Gly-SDS。DYY-III 型电泳仪为北京六一仪器厂生产 , SE600-15-1.5 型电泳槽为瑞典 Pharmacia 公司生产。

**1.3.3 染色 :** 蛋白质用考马斯亮蓝 R250 染色 ; 脂蛋白采用苏丹黑预染法 (莽克强等 , 1975 ; 华家栓等 , 1982) ; 糖蛋白采用过碘酸-Schiff 试剂染色法 (莽克强等 , 1975) ; 磷蛋白采用甲基绿-钼氨酸染色法 (莽克强等 , 1975) 。

**1.3.4 标准蛋白 :** PAGE 的标准蛋白为 Pharmacia 公司生产的非变性高分子量蛋白。SDS-PAGE 的标准蛋白为中国科学院上海细胞生物研究所生产的低分子量和次高分子量标准蛋白。

### 1.4 卵黄蛋白抗血清的制备

将提纯的卵黄蛋白用 0.4 mol/L NaCl 溶液溶解并稀释至浓度为 4 mg/mL , 与弗氏完全佐剂等量混合后 , 注射于雄兔 (2 ~ 3 kg/只) 腹股沟 , 注射量 2 mL/

只。以后每隔一周注射一次 , 第 2、3 次采用背部多点注射 , 注射量 2 mL/只。第 4、5 次耳静脉注射不含佐剂的卵黄蛋白溶液 , 注射量 1 mL/只。最后一次注射后的第 7 天耳静脉采血 , 分离血清 , 用 1% 琼脂糖双扩散法 (Izumi *et al.* , 1994) 测定效价 , 效价达 1:32 后隔一周颈动脉放血。最后分离得到的血清效价为 1:64。然后将血清与雄性褐飞虱成虫匀浆液混合 , 37℃ 水浴保温 1 h , 室温下 850 × g 离心 15 min , 取上清液得卵黄蛋白的特异性抗血清 , 置 -20℃ 下备用。

### 1.5 卵黄蛋白的免疫学特性分析

采用双向免疫扩散法 (李成文 , 1992) 分别将褐飞虱卵、雌成虫、雄成虫、初孵 1 龄若虫、5 龄若虫、白背飞虱 *Sogatella furcifera* 雌成虫匀浆稀释液 , 加入 1% 琼脂糖凝胶板的样品孔中 (孔径 3 mm) ; 样品孔排列呈梅花型 , 每孔加样量 10 μL ; 中心孔 (孔径 5 mm) 加入 15 μL 100 μg/mL 的褐飞虱卵黄蛋白抗血清。加样后 , 效价测定方法同上。将琼脂糖凝胶板放入电热恒温培养箱内 , 37℃ 保湿扩散 36 h , 取出后用 0.9% 生理盐水漂洗 5 h , 干燥后用 2.5% 考马斯亮蓝 R250 染色 , 脱色后根据染色情况判断结果。实验重复 3 次。

### 1.6 卵黄蛋白相对含量的测定

褐飞虱不同时期的卵样品液 , 一部分与一定量考马斯亮蓝 G250 混合 , 用 550 型酶标仪 (Bio-Rad 公司生产) 测定各样品在 595 nm 波长的 OD 值 , 根据标准曲线计算出样品的总蛋白浓度 ; 另一部分进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。

电泳结束后 , 凝胶经固定、染色、脱色后 , 用解剖刀将凝胶上各个样品的卵黄蛋白条带切下 , 用磷酸缓冲液洗脱 , 得到结合了考马斯亮蓝 R250 的卵黄蛋白洗脱液。用酶标仪测定洗脱液在 595 nm 波长的 OD 值 , 根据蛋白质标准曲线求出卵黄蛋白条带的蛋白相对含量 , 计算出电泳样品中卵黄蛋白的相对浓度 , 从而得到卵黄蛋白相对浓度与样品总浓度的比值 , 即卵黄蛋白的相对含量。测定重复 3 次 , 相对含量取平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 卵黄蛋白的电泳特性及其定性分析

1 g 褐飞虱刚产下的卵 , 用沉淀法提纯 , 经 3 次沉淀并在低温下透析 24 h 脱盐 , 冷冻干燥可获得约 70 mg 卵黄蛋白。得到的卵黄蛋白经 PAGE 分析 , 在 7.5% 分离胶中的相对迁移率 (卵黄蛋白迁移距离/

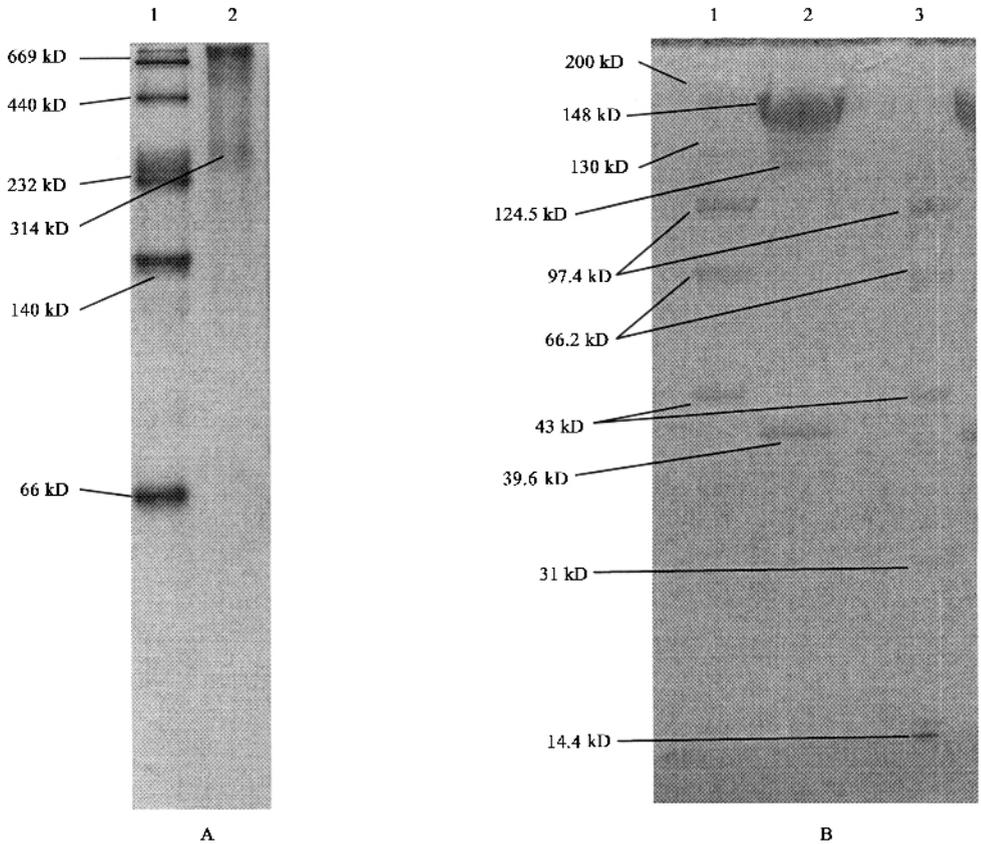


图1 褐飞虱卵黄蛋白(A)及其亚基(B)分子量的测定

Fig. 1 Determination of molecular weight of vitellin (A) and its subunits (B) in *Nilaparvata lugens*

A: 1. 标准蛋白 Molecular weight marker; 2. 褐飞虱卵黄蛋白分子量 Molecular weight of vitellin in *N. lugens*.

B: 1. 次高分子量标准蛋白 Sub-high molecular weight marker; 2. 纯化卵黄蛋白 Purified vitellin; 3. 低分子量标准蛋白 Low molecular weight marker.

染料迁移距离)为0.149(1.52 cm/10.20 cm);在5%分离胶中的迁移率为0.26(2.68 cm/10.30 cm)。过碘酸-Schiff试剂染色表明褐飞虱的卵黄蛋白是一种糖蛋白;苏丹黑预染后进行电泳证明褐飞虱的卵黄蛋白是一种脂蛋白;而经甲基绿钼氨酸染色,结果呈阴性,证明褐飞虱的卵黄蛋白不是磷蛋白。因此可以认为褐飞虱的卵黄蛋白是一种糖脂复合蛋白。

## 2.2 卵黄蛋白的分子量及亚基组成

通过PAGE作相对迁移率-分子量对数曲线,计算得出褐飞虱卵黄蛋白的分子量为314 kD(图1:A)。SDS-PAGE结果表明,褐飞虱卵黄蛋白明显分离成迁移率不同的3条多肽链,由相对迁移率-分子量对数曲线计算得知,3条肽链的分子量分别为148 kD、124.5 kD和39.6 kD(图1:B)。

## 2.3 卵黄蛋白的存在检验

将褐飞虱卵、雌成虫、1龄若虫、5龄若虫,褐飞虱卵黄蛋白抗血清及白背飞虱雌成虫匀浆稀释液进行双向免疫扩散实验,染色后结果见图2。从染色

结果可以看出:褐飞虱卵黄蛋白抗血清与雌成虫、卵、1龄若虫的匀浆液均有免疫沉淀反应,有抗原同源性,说明卵黄蛋白在雌成虫体内、卵内、1龄若虫体内均存在,而与5龄若虫无免疫沉淀反应,说明5龄若虫体内不含有卵黄蛋白。与白背飞虱雌成虫也无免疫反应,说明褐飞虱卵黄蛋白与白背飞虱卵黄蛋白在结构或组成方面有所不同。

## 2.4 胚胎发育过程中卵黄蛋白含量分析

室温条件下,褐飞虱从卵产出至胚胎发育48 h之内,卵黄蛋白相对含量变化不大;48 h后,卵黄蛋白被大量消耗,其相对含量迅速下降,至216 h时(即发育至孵化后第3天的若虫)褐飞虱若虫已经进入2龄,其体内卵黄蛋白相对含量几乎为零(图3)。

## 3 讨论

### 3.1 褐飞虱卵黄蛋白的分子量和亚基分子量

测定结果表明,褐飞虱卵黄蛋白的分子量为

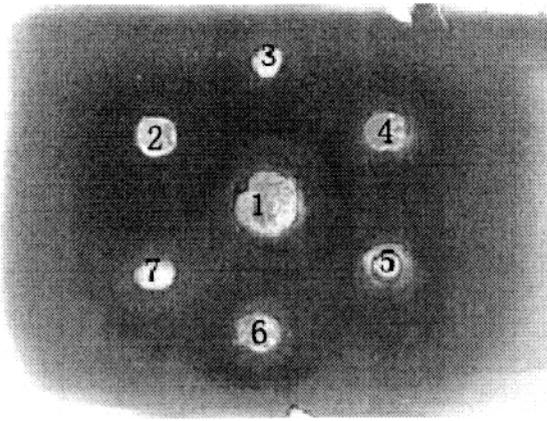


图 2 褐飞虱卵黄蛋白存在检验

Fig. 2 Test of the vitellin existence in *Nilaparvata lugens*

1. 褐飞虱卵黄蛋白抗血清 Antiserum of *N. lugens* vitellin ;
2. 雌成虫 Female adult ; 3. 雄成虫 Male adult ; 4. 卵 Egg ;
5. 5 龄若虫 5th-instar nymph ; 6. 1 龄若虫 1st-instar nymph ;
7. 白背飞虱雌成虫 Female adult of *Sogatella furcifera* .

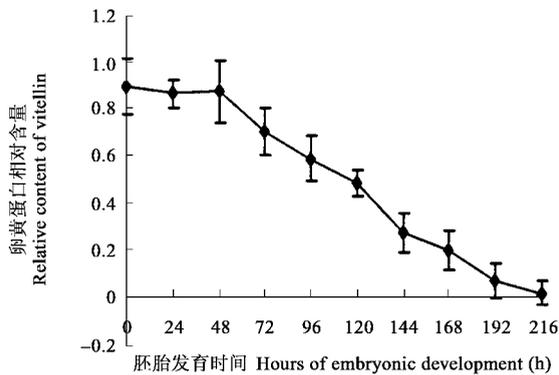


图 3 褐飞虱胚胎发育过程中卵黄蛋白含量的变化

Fig. 3 Change of vitellin content during embryonic development of *Nilaparvata lugens*

314 kD, 这与 Izumi 等(1994)所报道的“昆虫卵黄蛋白分子量在 210 ~ 652 kD 之间”结论相符。就已研究的昆虫来看,褐飞虱卵黄蛋白的分子量比较接近双翅目和部分鳞翅目昆虫,如埃及伊蚊卵黄蛋白的分子量为 360 kD (Hagedorn and Judson, 1972),家蚕卵黄蛋白的分子量为 440 kD (Ken and Okitusugu, 1983),而低于蜚蠊目、直翅目等目的昆虫,如德国小蠊卵黄蛋白的分子量为 652 kD (于长明等,1998),飞蝗卵黄蛋白的分子量为 550 kD (Chen and Wyatt, 1978)。但褐飞虱卵黄蛋白分子量的测定结果可能会受样品制备过程中蛋白质降解及碱性条件下电泳引起的样品降解的影响。近期,Cheng 和 Hou(2005)对褐飞虱雌成虫、雄成虫、5 龄若虫的匀浆液进行电泳的结果发现,雌成虫有一条 175 kD 的特殊条带;经荧光免疫法测定,其为卵黄原蛋白(vitellogenin)。

褐飞虱雌成虫体内卵黄原蛋白和卵黄蛋白的关系有深入探讨的必要。

SDS-PAGE 结果表明,褐飞虱卵黄蛋白明显地分成分子量为 148 kD、124.5 kD 和 39.6 kD 的 3 条多肽链。但卵黄蛋白前体分子从合成、释放到沉积的修饰过程中亚基比例有无变化,则需通过离体条件下标记合成和化学计算法来测定。

### 3.2 卵黄蛋白的存在及种间差异

于长明等(1998)研究发现,卵黄蛋白是雌虫所特有的,并在一定发育阶段由特定组织(一般为脂肪体)产生,经血淋巴到达卵巢沉积而成;卵黄蛋白的发生过程受激素调控。本实验通过双向扩散免疫反应,证明初孵的褐飞虱 1 龄若虫体内含有卵黄蛋白,推测这部分卵黄蛋白可能来源于雌成虫,卵内的卵黄蛋白在胚胎发育过程中被部分利用,另有部分转移到初孵若虫体内。褐飞虱 5 龄若虫体内未测得卵黄蛋白,这说明褐飞虱 5 龄若虫尚未开始合成卵黄蛋白,从而证明褐飞虱的卵黄蛋白只存在于生殖期的雌成虫体内。

卵黄蛋白具有种的特异性,叶恭银等(1998)在研究天蚕的卵黄蛋白时,比较了天蚕(大、小亚基的分子量分别为 180 kD 和 40 kD)与柞蚕(170 kD 和 45 kD)、蓖麻蚕(180 kD 和 43 kD)、惜古比天蚕蛾(180 kD 和 47 kD)、家蚕(180 kD 和 42 kD)的卵黄蛋白亚基的组成特性,发现它们大、小两个亚基的分子量相近,但与橐蚕(230 kD 和 55 kD)相比,则相差较远;由此认为,卵黄蛋白的亚基组成可在一定程度上反映其亲缘关系。叶恭银等(1998)还发现天蚕卵黄蛋白抗血清与柞蚕卵黄蛋白呈阳性反应,而与家蚕呈阴性反应,因此认为卵黄蛋白的免疫特性在一定程度上也能反映种间的亲缘关系。本项研究发现,褐飞虱卵黄蛋白免疫血清与褐飞虱雌成虫有免疫反应,而与白背飞虱雌成虫无免疫反应,说明褐飞虱与白背飞虱的亲缘关系有一定距离,其卵黄蛋白也会有一定的差异。

### 3.3 卵黄蛋白在胚胎发育中作用的探讨

迄今,关于卵黄蛋白在昆虫胚胎发育过程中作用的研究很少。一般认为卵黄蛋白在胚胎发育中有营养源、运输、机械支持等方面的作用,如:Postlethwait 和 Giorgi(1985)、彭宇等(2000)认为卵黄蛋白为发育中的胚胎提供营养物质;Wolf-Neis(1976)证明卵黄蛋白有运输某种必需物质的作用。

褐飞虱胚胎发育过程中卵黄蛋白的含量变化(图 3),与 Ken 和 Okitusugu(1983)研究家蚕卵黄蛋

白在胚胎发育过程中变化的结果相似,作者认同 Postlethwait 和 Giorgi (1985) 卵黄蛋白为发育中的胚胎提供营养物质”的观点,这样才能较合理地解释卵黄蛋白在胚胎发育过程中逐渐减少的原因。

从褐飞虱胚胎发育过程中卵黄蛋白含量的变化曲线(图3)来看,在卵产出母体 48 h 后,胚胎发育进入附肢形成阶段,胚胎的新陈代谢极其旺盛,卵黄蛋白被大量消耗,其相对含量迅速下降;144 h 后,若虫孵化,并已开始取食,但卵黄蛋白的相对含量仍然继续减少,推测此时卵黄蛋白可能继续作为营养物质在消耗,以保证初孵若虫能够度过孵化初期生命的脆弱阶段。也可能是卵黄蛋白转化为初孵若虫体内某种缺乏但又必需的物质,或者卵黄蛋白本身就运输了初孵若虫必需的蛋白质,以保证若虫的正常发育。这种趋势一直延续到褐飞虱进入 2 龄若虫阶段。对卵黄蛋白的有关作用尚需进一步研究。

### 参考文献 (References)

- Chen TT, Wyatt GR, 1978. Vitellin and vitellogenin from locusts (*Locusta migratoria*): properties and post-translational modification in the fat body. *Biol. Chem.*, 253: 5 324-5 331.
- Cheng DJ, Hou RF, 2005. Determination and distribution of a female-specific protein in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae). *Tissue and Cell*, 37(1): 37-45.
- Chino H, Chenzei Y, Wyatt GR, 1977. Further characterization of lepidopteran vitellogenin from haemolymph and mature eggs. *Insect Biochem.*, 7: 125-131.
- Dejmal RK, Brookes VJ, 1972. Solubility and electrophoretic properties of ovarian protein of the cockroach, *Leucophaea maderae*. *Insect Physiol.*, 14: 371-381.
- Gong H, Li QJ, 1992. Vitellogenesis and its hormonal regulation in the domestic fly, *Musca domestica*. *Acta Entomol. Sin.*, 35(2): 129-137. [龚和,李乾君,1992.家蝇的卵黄发生及其激素调节.昆虫学报,35(2): 129-137]
- Gong H, Zhang JZ, Zhai QH, 1982. Characteristics of the yolk protein of *Coccinella septempunctata* L. *Acta Entomol. Sin.*, 25(1): 9-15. [龚和,张建中,翟启慧,1982.七星瓢虫卵黄蛋白的理化性质.昆虫学报,25(1): 9-15]
- Guo YJ, 2001. Experiment Technique of Protein Electrophoresis. Beijing: Science Press. 54-160. [郭尧君,2001.蛋白质电泳实验技术.北京:科学出版社.54-160]
- Guo YJ, Yu T, 1996. New rapid semi-dry technique used in anode PAGE and cathod PAGE. *Prog. Biochem. Biophys.*, 23(4): 359-364. [郭尧君,俞添,1996.阳极电泳和阴极电泳的快速半干新技术.生物化学与生物物理学进展,23(4): 359-364]
- Hagedorn HH, Judson GL, 1972. Purification and site of synthesis of *Aedes aegypti* yolk protein. *Exp. Zool.*, 182: 367-378.
- Hua JS, Xi GL, Yi QC, 1982. Practical Techniques of Protein Chemistry. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press. 52-56. [华家栓,西国良,易庆成,1982.实用蛋白质化学技术.上海:上海科学技术出版社.52-56]
- Izumi S, Yano K, Yamamoto Y, 1994. Review yolk protein from insect eggs: structure, biosynthesis and programmed degradation during embryogenesis. *Insect Physiol.*, 40(9): 735-746.
- Ken I, Okitusugu Y, 1983. Egg-specific protein in the silkworm, *Bombyx mori*: purification, properties, localization and titre changes during oogenesis and embryogenesis. *Insect Biochem.*, 13(1): 71-80.
- Kunkel JM, Pan ML, 1976. Selectivity of yolk protein uptake: comparison of vitellogenesis of two insects. *Insect Physiol.*, 22: 809-818.
- Li CW, 1992. Immunochemistry Techniques. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press. 182-190, 235-238. [李成文,1992.现代免疫化学技术.上海:上海科学技术出版社.182-190, 235-238]
- Li YM, 1999. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis. In: He ZX, Zhang SZ eds. Electrophoresis. Beijing: Science Press. 127-139. [李玉民,1999. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳.见:何忠效,张树政 主编:电泳.北京:科学出版社.127-139]
- Mang KQ, Xu NZ, Fang RX, 1975. Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Beijing: Science Press. 58-59. [莽克强,徐乃正,方荣祥,1975.聚丙烯酰胺凝胶电泳.北京:科学出版社.58-59]
- Peng Y, Hu C, Zhao JZ, 2000. Studies on vitellin of water wolf spider *Pirata piraticus*. *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)*, 26(1): 69-74. [彭宇,胡萃,赵敬钊,2000.真水狼蛛 *Pirata piraticus* 卵黄蛋白的研究.浙江大学学报(农业与生命科学版), 26(1): 69-74]
- Postlethwait JH, Giorgi F, 1985. Vitellogenesis in insects in developmental biology. In: Browder WL ed. Comprehensive Synthesis. New York: Plenum Press. 85-126.
- Wolf-Neis R, 1976. Immunohistological studies on the distribution of yolk protein in the stick insect (*Carasius morosus*). *Insect Physiol.*, 22: 865-869.
- Ye GY, Hu C, Gong H, 1998. Physicochemical property of vitellogenin and vitellin of wild silkworms, *Antheraea yamamai*. *Science of Sericulture*, 24(4): 248-249. [叶恭银,胡萃,龚和,1998.天蚕卵黄蛋白的主要理化性质.蚕业科学,24(4): 248-249]
- Yu CM, Li CW, Liu Q, 1998. Development of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of vitellin content in *Blattella germanica*. *Acta Parasitol. Med. Entomol. Sin.*, 5(4): 246-252. [于长明,李成文,刘泉,1998. ELISA 测定德国小蠊卵黄蛋白含量方法的建立.寄生虫与医学昆虫学报,5(4): 246-252]

(责任编辑:黄玲巧)