

麦红吸浆虫滞育不同时期幼虫 蛋白质双向电泳分析

成卫宁 李怡萍 杨 杰 许向利 仵均祥*

(西北农林科技大学应用昆虫学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 为筛选与麦红吸浆虫滞育相关的蛋白, 采用双向电泳及图像分析技术分析了麦红吸浆虫滞育前、后和滞育期的蛋白质图谱及其变化。结果表明, 在滞育前幼虫的双向电泳图谱上平均可检测到蛋白质点约 300 个, 其它时期约 275 个, 其中多数分布在分子量 8.0 ~ 50.0 kD、等电点 4.0 ~ 9.0 的区域。在所检测到的蛋白质点中, 26 个在滞育前特异表达; 3 个在滞育前缺失, 其它阶段表达; 2 个在滞育后 200 天特异表达; 3 个在滞育前和滞育解除后表达, 滞育期缺失; 34 个在所有时期均表达, 但各时期的表达量存在显著差异。

关键词: 麦红吸浆虫; 滞育; 蛋白质; 双向电泳

Two-dimensional electrophoresis of proteins in the pre-diapause, diapause and post-diapause larvae of wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin)

Cheng Weining Li Yiping Yang Jie Xu Xiangli Wu Junxiang*

(Key Laboratory of Applied Entomology, Northwest A & F University, Yangling
712100, Shaanxi Province, China)

Abstract: In order to screen diapause associated protein of wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin), two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and image analysis system were used to analyze differential expression of proteins extracted from pre-diapause, diapause and post-diapause larvae of wheat blossom midge. On 2-DE gels, about 300 protein spots were detected in the extracts of pre-diapause larvae and 275 for those in each of other stages, and the majority of these spots were located in the area 8.0 – 50.0 kD and pI 4.0 – 9.0. Among detected proteins, 26 were unique in pre-diapause, 3 were expressed during diapause and post-diapause but missing in pre-diapause, 2 were unique in diapause 200 days, 3 were expressed during pre-diapause and post-diapause but absent in diapause stages, 34 were expressed in all stages but showed different expression levels among larvae in different stages.

Key words: *Sitodiplosis mosellana*; diapause; protein; 2-dimensional gel electrophoresis

滞育是由遗传控制的生长发育暂停现象, 能使昆虫在不利的环境下存活, 并使其生活史中的活动阶段与食料的获得协调一致^[1-2]。由于滞育在昆虫

种的延续和种群繁衍中具有重要作用, 因此, 深入了解其机制在农业害虫治理中尤为重要。

近年来关于昆虫滞育的分子机制已经有较多报

基金项目: 陕西省自然科学基金(2009JM3003), 教育部重点项目(105165), 国家自然科学基金(30370936)

作者简介: 成卫宁, 女, 1967 年生, 副教授, 研究方向为害虫综合治理, email: cwning@126.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), email: junxw@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2009-10-27

道。在一些具有滞育特性的昆虫中已经发现了一种或几种滞育关联蛋白(diapause associated protein, DAP)。Salama 等^[1]研究表明,棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella* 滞育幼虫的血淋巴中存在一种分子量为 490 kD 的糖脂蛋白,而非滞育幼虫中不存在该蛋白;Brown 等^[3]研究发现,西南玉米秆草螟 *Diatraea grandiosella* 滞育幼虫脂肪体和血淋巴中分子量 41 kD 的蛋白含量较高,而非滞育幼虫中该蛋白含量甚微;Lewis 等^[4]和 Lee 等^[5]分别研究发现棉铃象甲 *Anthonomus grandis* 血淋巴中 77 kD 蛋白和舞毒蛾 *Lymantria dispar* 隐 1 龄幼虫中、后肠中 30、35、55 和 60 kD 蛋白均与滞育相关。

麦红吸浆虫 *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) 是我国小麦生产上重要的农业害虫,以老熟 3 龄幼虫结茧滞育^[6]。有关麦红吸浆虫的滞育调控机制,国内外学者进行了大量的研究,但主要集中于环境生态学^[7-8]和生理生化方面^[9-10],而对麦红吸浆虫滞育过程中 DAP 的研究,迄今未见报道。

自 O' Farrell^[11] 提出双向电泳(2-DE)技术以来,经过不断发展和完善,这项技术已成为目前用于蛋白质分析的关键核心技术,近年来被广泛应用于昆虫诱导性免疫^[12]、抗性机制^[13]和分子病理^[14]等众多昆虫学研究中。为筛选与麦红吸浆虫滞育相关的蛋白,本研究采用该技术分析了麦红吸浆虫滞育前、后和滞育期的蛋白质图谱及其变化。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

2006 年 5 月小麦黄熟期,在河南省濮阳县大量采集被麦红吸浆虫危害的麦穗,带回西北农林科技大学置养虫圃中,放入前先采集部分老熟幼虫,即滞育前幼虫,让老熟幼虫自然脱穗落土进入滞育,然后于进入滞育后 100 和 200 天分别采集滞育圆茧,翌年 3 月滞育解除后采集活动幼虫,置于 -80 ℃ 超低温冰箱保存备用。

1.2 主要仪器和试剂

IPGphor 等电聚焦系统、Hoefer SE 600 垂直电泳系统和 ImageScanner 凝胶扫描仪,Amersham Biosciences 公司生产;PDQuest 7.4 凝胶分析软件,Bio-Rad 公司生产;Flexi-Dry 冷冻干燥机,美国 FTS Systems 公司生产;MIKRO 22R 1110 型高速冷冻离心机,德国 Zentrifugen 公司生产。

pH 3-10L IPG 预制胶条、尿素、CHAPS、IPG 缓

冲液和 DTT,购于华美生物工程公司;低分子量标准蛋白、十二烷基磺酸钠、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺、三羟甲基氨基甲烷和 2D Quant Kit 蛋白定量试剂盒,购自 Amersham Biosciences 公司;溴酚蓝、考马斯亮蓝 R-250、甘油和磷酸,购于北京鼎国试剂公司。

1.3 蛋白质样品的制备

取同一时间采集的幼虫 100 头,双蒸水冲洗,滤纸吸干体表水分后移入预冷的玻璃匀浆器中,加入 1.2 mL 0.02 mol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲液,在冰浴中充分研磨提取,匀浆液于 4 ℃、10 000 r/min 条件下离心 15 min,上清液在超低温冰箱中冷冻过夜,Flexi-Dry 冷冻干燥机中冷冻干燥后加入样品水合缓冲液(8 mol/L 尿素、2% CHAPS、0.5% IPG 缓冲液、1% DTT)充分旋涡混匀,离心后取上清液,采用 2D Quant Kit 蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度。重复 3 次。

1.4 双向凝胶电泳

第一向等点聚焦电泳主要参照 IPGphor 等电聚焦系统使用指南进行。采用长度 13 cm、pH 3~10 的线性预制干胶条,上样量 250 μL(含蛋白 200 μg),水化和聚焦在 20 ℃ 自动进行,其中低电压 30 V、12 h,聚焦 500 V、1 h,1 000 V、1 h,8 000 V、2 h。等电聚焦结束后,胶条分别在平衡液 A(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8、6 mol/L 尿素、30% 甘油、2% SDS、0.0002% 溴酚蓝、1% DTT)和平衡液 B(2.5% 碘乙酰胺替代 1% DTT,其余组分同平衡液 A)中各平衡 15 min,然后用浓度为 15% 的均一胶进行第二向 SDS-PAGE,电泳条件为,每根胶条先 10 mA 电泳 20 min,然后 20 mA 恒流至结束。电泳结束后凝胶采用考马斯亮蓝染色法染色。

1.5 凝胶图像分析

利用 ImageScanner 透射扫描仪获取图像,用 PDQuest 7.4 软件包进行图像分析,操作按说明书进行。其中表达水平相差 2.5 倍以上,且 3 次重复中都出现相同变化的蛋白质点即差异点。

2 结果与分析

2.1 麦红吸浆虫不同滞育时期幼虫蛋白质 2-DE 图谱

对不同滞育时期幼虫蛋白质进行 2-DE 分离,每样本 3 次重复。结果显示,各次重复分离效果均较好,图 1 为不同时期代表性胶。图像分析结果表明,滞育前幼虫的 2-DE 图谱上平均可检测到约 300 个蛋白质点,其中 266 个分布在分子量 8.0~50.0

kD、等电点 4.0 ~ 9.0 的区域,占总蛋白数的 88.7%;幼虫入土滞育后,各时期蛋白质表达数有所下降,约为 275 个,且也多数集中在上述区域。

2.2 不同滞育时期蛋白质点差异比较分析

应用 PDQuest 7.4 软件对各时期 2-DE 图谱蛋白质点进行定性和定量分析,比较各蛋白质点位置和含量。结果显示,仅少数蛋白质点在各时期表达水平呈显著差异。进一步分析表明,26 个蛋白质点在滞育前特异表达,进入滞育后消失,其中点 1、2、3

丰度和分辨率较高,其余多为分布在分子量 28 ~ 46 kD、等电点 4.2 ~ 9.0 区域内的低丰度蛋白;点 4、5、6 除滞育前以外的其它时期均表达;点 7、8 在进入滞育后 200 天特异表达;点 9、10、16 在滞育前和滞育解除后表达,滞育期缺失;其余 34 个点在所有时期均表达,但在表达量上存在显著差异,如滞育前点 11、12 表达量显著高于其它各时期,而点 13 表达量显著低于其它各时期,点 14、15 滞育前和滞育解除后表达量显著低于滞育期(图 1、表 1)。

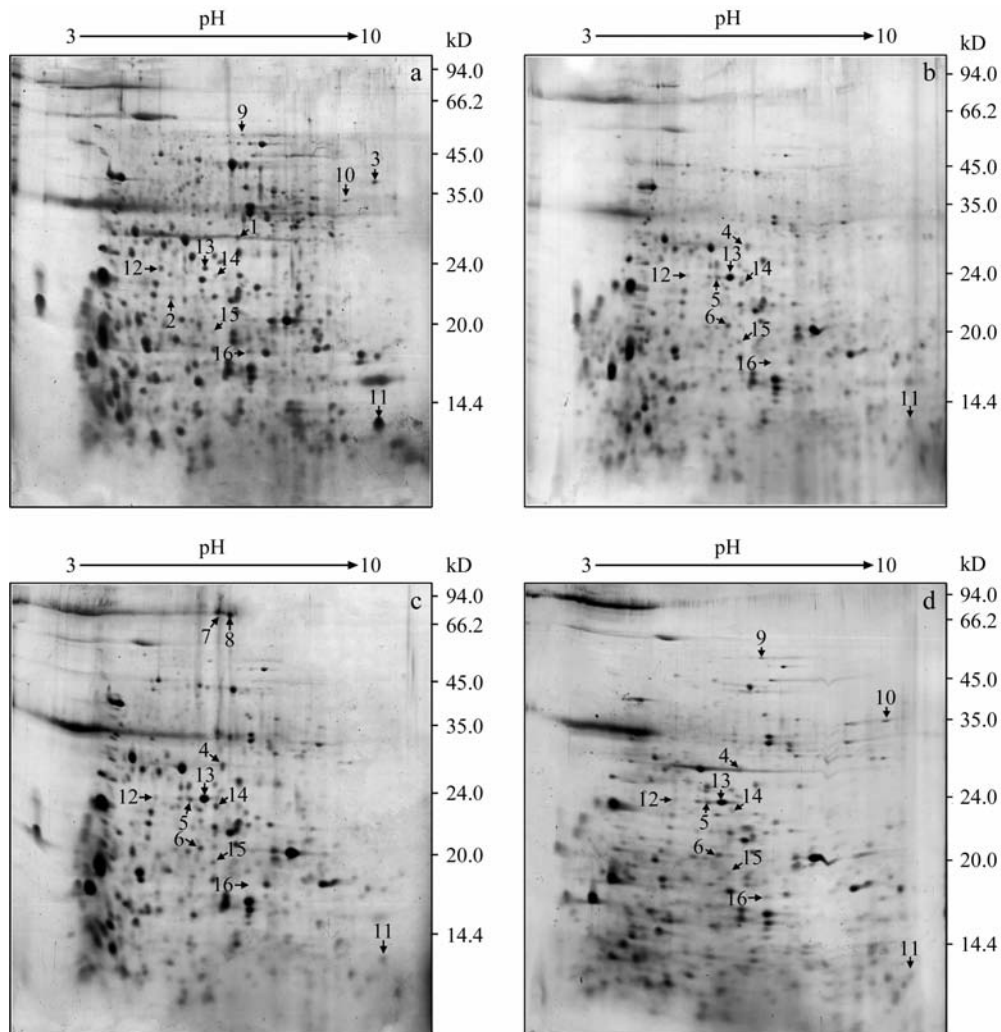


图 1 麦红吸浆虫滞育不同时期幼虫蛋白质双向电泳图

Fig. 1 Two-dimensional electrophoresis maps of proteins in wheat blossom midge larvae of different diapause stages

注: a:滞育前; b:滞育 100 天; c:滞育 200 天; d:滞育解除后。Note: a: Pre-diapause; b: diapause 100 d; c: diapause 200 d; d: post-diapause.

在这些差异蛋白质点中,等电点在 5.0 ~ 6.0 之间的有 2 个,6.01 ~ 7.00 之间的有 10 个,7.01 以上的有 4 个,即酸性蛋白共 12 个,占总数的 75.0%;碱性蛋白共 4 个,占 25.0%。分子量在 20.0 kD 以

下的有 3 个,20.01 ~ 30.00 kD 之间的有 8 个,30.01 ~ 40.00 kD 之间的有 2 个,40.01 kD 以上的有 3 个,即 62.5% 的差异蛋白质点分布在分子量 20.01 ~ 40.00 kD 之间(表 1)。

表 1 不同滞育阶段部分差异表达蛋白质点的相对表达模式、分子量及等电点
Table 1 The relative expression level, molecular weight and pI of partial differentially
expressed proteins in different diapause stages

编号 Number	滞育前 Pre-diapause	滞育 100 天 Diapause 100 d	滞育 200 天 Diapause 200 d	滞育解除后 Post-diapause	分子量(kD) Molecular weight	等电点 pI
1	+	-	-	-	28.12	6.79
2	+	-	-	-	21.75	5.78
3	+	-	-	-	39.51	9.06
4	-	+	+	+	27.41	6.60
5	-	+	+	+	23.58	6.03
6	-	+	+	+	20.22	6.21
7	-	-	+	-	74.48	6.56
8	-	-	+	-	72.54	6.77
9	+	-	-	+	52.22	7.00
10	+	-	-	+	34.82	8.79
11	1	0.30	0.23	0.04	11.05	9.22
12	1	0.29	0.35	0.32	23.99	5.48
13	1	4.43	2.89	3.05	23.59	6.30
14	1	4.35	4.26	1.15	23.00	6.50
15	1	3.44	3.39	1.32	18.51	6.49
16	+	-	-	+	16.48	7.05

注: -: 缺失蛋白; +: 特异蛋白。表中 3~5 列数据为其它阶段蛋白表达量与滞育前蛋白表达量的比值。Note: -: Missing protein; +: unique protein. The data in columns 3-5 of the table were the rates of protein abundance in other stages to that in pre-diapause stage.

3 讨论

蛋白质是生物细胞赖以生存的各种代谢和调控的执行者,是基因功能的直接体现者,对 DAP 的研究,将有助于了解昆虫滞育的分子机制,然而由于研究手段的限制,以往对 DAP 的研究,大多是应用 SDS-PAGE 电泳对 DAP 进行定性和定量分析^[1,3-5],因而无法了解其生物学功能。双向电泳技术是近些年发展起来的用于蛋白质分离的最佳技术,作者应用该技术,对麦红吸浆虫滞育前后和滞育期幼虫蛋白质组成进行了分析。结果表明,不同滞育时期幼虫蛋白质组成及含量存在一定的差异,具体表现在蛋白质数量的增减、特异蛋白的有无和共有蛋白含量的高低等方面。

从蛋白质的表达数量可以看出,滞育前可检测到的斑点数为 300 个,进入滞育后降为 275 个,这与 Li 等^[15]报道的滞育麻蝇 *Sarcophaga crassipalpis* 蛹蛋白质数低于非滞育蛹的结果相似,也与昆虫进入滞育后,生长发育暂时停止、代谢水平极低、所需表达的酶蛋白种类较少的特点相一致。

从蛋白质的匹配情况可以看出,各时期均存在一定数量的特异或缺失蛋白,它们可能与麦红吸浆虫的滞育相关。如点 1、2、3 在滞育前特异表达,滞

育后不表达,其表达方式与昆虫滞育后生长发育暂时停止的特点相一致,推测它们在麦红吸浆虫体内停止表达可能诱导滞育。点 7、8 在进入滞育后 200 天,即冬季滞育阶段特异表达,说明这两个蛋白与麦红吸浆虫的抗冻性有关,即在冬季寒冷的条件下可能降低昆虫体内的过冷却点以保证其存活。点 9、10、16 在滞育前和解除滞育后表达,滞育期缺失,其表达特点与昆虫滞育发育的模式相一致,说明其缺失诱导滞育发生,再次表达导致滞育终止。

从各时期共有蛋白的表达量可以看出,34 个蛋白在各时期的表达量存在显著差异,这些蛋白也可能与麦红吸浆虫的滞育相关。如点 11、12 滞育后表达量明显下降,符合昆虫进入滞育后代谢水平下降的特点。点 14、15 滞育期表达量显著高于滞育前和滞育解除后,与维持麦红吸浆虫滞育所需某些化学物质如甘油、海藻糖以及合成这些化学物质所需酶蛋白(如糖元磷酸化酶)在滞育期含量高于滞育前和滞育解除后的结论相一致^[16-18],说明这两个蛋白可能与麦红吸浆虫滞育的维持有关。

综上所述,本研究通过双向电泳技术对麦红吸浆虫滞育不同时期幼虫蛋白质组分进行了分析,找出了各时期的差异蛋白,这些蛋白可能与麦红吸浆虫的滞育相关。

致谢:河北师范大学生命科学院刘敬泽老师为本研究提供帮助,特此致谢。

参 考 文 献 (References)

- [1] Salama M S, Miller T A. A diapause associated protein of the pink bollworm *Pectinophora gossypiella* Saunders. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 1992, 21(1): 1 - 11
- [2] 李文香, 李建成, 路子云, 等. 中红侧沟茧蜂滞育临界光周期和敏感光照虫态的测定. 昆虫学报, 2008, 51(6): 635 - 639
- [3] Brown J J, Chippendale G M. Juvenile hormone and a protein associated with the larval diapause of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. Insect Biochemistry, 1978, 8(5): 359 - 367
- [4] Lewis D K, Spurgeon D, Sappington T W, et al. A hexamerin protein, AgSP-1, is associated with diapause in the boll weevil. Journal of Insect Physiology, 2002, 48(9): 887 - 901
- [5] Lee K Y, Denlinger D L. Diapause-regulated proteins in the gut of pharate first instar larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*, and the effect of KK-42 and neck ligation on expression. Journal of Insect Physiology, 1996, 42(5): 423 - 431
- [6] 袁锋, 花保祯, 仵均祥, 等. 小麦吸浆虫成灾规律与控制. 北京: 科学出版社, 2004
- [7] Basedow T. The effect of temperature and precipitation on diapause and phenology in the wheat blossom midges *Contarinia tritici* (Kirby) and *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (Diptera: Cecidomyiidae). Zoologische Jahrbucher Abteilung für Systematik Ökologie und Geographie der Tiere, 1977, 104(3): 302 - 326
- [8] Hinks C F, Doane J F. Observations on rearing and diapause termination of *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae) in the laboratory. Journal of Economic Entomology, 1988, 81(6): 1816 - 1818
- [9] 仵均祥, 袁锋, 李怡萍. 麦红吸浆虫幼虫滞育状态及其核酸含量变化研究. 西北农林科技大学学报, 2003, 31(6): 49 - 56
- [10] Wu J X, Yuan F, Zhang Y M. Changes of fatty acids in larvae of the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (Diptera: Cecidomyiidae). Entomologia Sinica, 2001, 8(4): 315 - 322
- [11] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. Journal of Biological Chemistry, 1975, 250(10): 4007 - 4021
- [12] Levy F, Bulet P, Ehret-Sabatier L. Proteomic analysis of the systemic immune response of *Drosophila*. Molecular & Cellular Proteomics, 2004, 3(5): 156 - 166
- [13] 蒋才富, 刘凯于, 彭蓉, 等. Bt Cry1Ac 毒素筛选的粉纹夜蛾离体抗性细胞与敏感细胞蛋白质组的差异分析. 昆虫学报, 2004, 47(5): 686 - 690
- [14] Kaeslin M, Pfister-Wilhelm R, Molina D, et al. Changes in the haemolymph proteome of *Spodoptera littoralis* induced by the parasitoid *Chelonus inanitus* or its polydnavirus and physiological implications. Journal of Insect Physiology, 2005, 51(9): 975 - 988
- [15] Li A Q, Popova-Butler A, Dean D H, et al. Proteomics of the flesh fly brain reveals an abundance of upregulated heat shock proteins during pupal diapause. Journal of Insect Physiology, 2007, 53(4): 385 - 391
- [16] 仵均祥, 袁锋, 苏丽. 麦红吸浆虫幼虫滞育期间糖类物质变化. 昆虫学报, 2004, 47(2): 178 - 183
- [17] Wu J X, Yuan F. Changes of glycerol content in diapause larvae of the orange wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) in various seasons. Entomologia Sinica, 2004, 11(1): 27 - 35
- [18] 成卫宁, 李修炼, 李怡萍, 等. 麦红吸浆虫不同滞育期四种糖代谢酶活力分析. 昆虫学报, 2009, 52(2): 133 - 139