

# 烟夜蛾滞育蛹和非滞育蛹血淋巴 可溶性蛋白含量及图谱初步研究

高玉红<sup>1,2</sup>, 王冬燕<sup>1,3</sup>, 郭线茹<sup>1\*</sup>

(1. 河南农业大学 植物保护学院 河南 郑州 450002; 2. 郑州职业技术学院 河南 郑州 450121; 3. 河南省汝阳县内埠镇政府 河南 汝阳 471200)

**摘要:** 利用考马斯亮蓝法和 SDS-PAGE 电泳法测定并分析了烟夜蛾滞育蛹和非滞育蛹血淋巴可溶性蛋白含量及其组成。结果表明, 非滞育蛹在化蛹后至羽化前可溶性蛋白呈现出“降低—升高—降低”的变化趋势, 在 5 日龄时含量最高, 而滞育蛹呈现出持续降低的变化趋势; 除 2 日龄雌蛹外, 其他日龄滞育与非滞育蛹的雌、雄个体间蛋白质含量均存在显著差异。蛋白质 SDS-PAGE 电泳图谱表明, 滞育蛹与非滞育蛹血淋巴的蛋白组成存在明显差异。推测滞育蛹血淋巴可溶性蛋白含量及组成的变化与其抗寒性有关。

**关键词:** 烟夜蛾; 滞育; 血淋巴; 可溶性蛋白

中图分类号: Q969.436.4 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)02-0294-04

## A Preliminary Study on the Content and Electrophoresis Patterns of Soluble Protein in Hemolymph from Diapause and Non-diapause Pupae of *Helicoverpa Assulta*

GAO Yu-hong<sup>1,2</sup>, WANG Dong-yan<sup>1</sup>, GUO Xian-ru<sup>1\*</sup>

(1. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Zhengzhou Vocational Technology College, Zhengzhou 450002, China; 3. the Government of Neibu Town, Ruyang County, Henan Province, 471200, China)

**Abstract:** The content and composition of soluble protein in the hemolymph from diapause and non-diapause pupae of *Helicoverpa assulta* were measured and analyzed by using Bradford and SDS-PAGE. The results showed that, the change tendency of soluble protein content in the non-diapause was down-up-down from pupation to eclosion, and the largest content appeared on the fifth day after pupation, but the content in the diapause pupae decreased continuously. Except for 2-day female pupae, there were significant differences in the soluble protein content between the female and male pupae. The electrophoretograms of SDS-PAGE indicated that there were significant differences in the composition and content of soluble protein between diapause and non-diapause pupae. So it could be deduced that these changes of soluble protein of hemolymph in the diapause pupae were related to the cold-resistance of *H. assulta*.

**Key words:** *Helicoverpa assulta*; diapause; hemolymph; soluble protein

收稿日期: 2011-10-17 修回日期: 2011-12-29

基金项目: 河南省教育厅自然科学基金项目(2006180010)

作者简介: 高玉红(1979—)女, 讲师, 主要从事植物病虫草害研究, E-mail: Gaoyuhong2008@163.com; \* 通讯作者:

郭线茹, 教授, 博士, E-mail: guoxianru@126.com。

昆虫能否抵御冬季低温是决定其分布范围及来年种群建立和发展的关键因素之一。昆虫对低温的适应方式有多种,其中之一就是形成抗性强的滞育个体<sup>[1-3]</sup>。与非滞育个体相比,昆虫个体某些器官的生理功能发生了变化,其血淋巴中的化学成份也发生了量或质的变化,特别是蛋白质的变化。一些幼虫和成虫的脂肪体或血淋巴中有一种或数种蛋白质,在昆虫滞育个体中保持着较高的浓度,且随着滞育的终止而逐渐消失,这类蛋白被认为与滞育的发生有关,称为滞育关联蛋白(Diapause Associated Proteins, DAP),而在昆虫非滞育个体中无此类蛋白质或其含量极微<sup>[4-5]</sup>。蛋白质作为储藏物质和生物功能大分子,与昆虫滞育的发生、维持和终止有着密切的关系<sup>[6-9]</sup>。为探明烟夜蛾滞育期间血淋巴可溶性蛋白是否发生变化以及有无滞育关联蛋白的存在,笔者采用考马斯亮蓝法和 SDS-PAGE 电泳法分别对滞育蛹和非滞育蛹血淋巴可溶性蛋白的含量和蛋白图谱进行了分析和比较,以期为进一步探明烟夜蛾滞育的生理生化机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

烟夜蛾采自郑州郊区烟田和辣椒田,用人工饲料在人工气候箱中饲养。正常饲养温度为(26±1)℃,相对湿度为70%~80%,光周期为16L:8D。蛹的滞育诱导条件为温度20℃,相对湿度70%~80%,光周期9L:15D,从3日龄幼虫开始诱导。

### 1.2 主要试剂

SDS-PAGE 有关试剂如丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺、甘氨酸、三羟甲基甲烷(Tris)、十二烷基磺酸钠(SDS)、溴酚蓝、考马斯亮蓝 R-250、过硫酸胺(AP)、四甲基乙二胺(TEMED)、甲醇、冰乙酸等,均有上海生物工程有限公司生产。

标准蛋白(宝生物工程(大连)有限公司):磷酸酶 b(97.2 ku)、牛血清蛋白(66.4 ku)、卵清蛋白(44.3 ku)、碳酸酐酶(29.0 ku)、胰蛋白酶抑制剂(20.1 ku)。

### 1.3 血淋巴采集

参考王智渝等<sup>[4]</sup>和郭郭等<sup>[10]</sup>的方法,分别采集20~30头预蛹及2、5、9日龄雌、雄蛹的血淋巴,注入预先加入少量苯基硫脲的1.5 mL离心管中,密封保存于-20℃备用。

### 1.4 样品处理

血淋巴样品在6 000 r/min离心5 min;取上清液100 μL至1.5 mL离心管中,加入10%磺基水杨酸100 μL,6 000 r/min离心5 min;取150 μL上清液于10 mL小烧杯中,加入5 mL纯水,混匀;用4 mol/L NaOH溶液在pH电极的指示下辅以6 mol/L HCl调节pH值至9.20~9.35;将调好的溶液在10 mL容量瓶中用超纯水定容混匀;用一次性1 mL注射器吸取1 mL溶液,取下针头换上0.5 μm过滤膜滤头,轻轻注射过滤于1.5 mL干净离心管中,4℃保存备用。

### 1.5 血淋巴蛋白含量的测定

采用Bradford方法测定<sup>[11]</sup>。将收集的血淋巴6 000 r/min离心5 min,去除血细胞和组织碎片,取10 μL上清液至试管中;补加蒸馏水90 μL至终体积100 μL;加入1 mL Bradford溶液并震荡混匀;在2 min后测定A<sub>595</sub>值。每个处理3次重复,根据标准曲线计算血淋巴蛋白含量。

### 1.6 烟夜蛾血淋巴可溶性蛋白电泳

SDS-PAGE电泳参照王方海等<sup>[7]</sup>的方法进行。电泳在4℃左右冷柜中进行,电泳时间60~90 min。电泳结束后,取出凝胶并置于考马斯亮蓝染色液(含0.1%的考马斯亮蓝R-250,40%甲醇、10%冰乙酸)中固定、染色30 min,然后在脱色液(含40%甲醇,10%冰乙酸)中脱色。最后用BIO-RAD 1125B型干胶仪制成干胶板并在Joyce Loebel Chromoscan 3电泳扫描仪上扫描。

## 2 结果与分析

### 2.1 烟夜蛾蛹血淋巴中的可溶性蛋白质含量

对烟夜蛾不同日龄滞育蛹和非滞育蛹血淋巴中可溶性蛋白含量的分析结果见表1。

表 1 烟夜蛾不同日龄非滞育蛹与滞育蛹血淋巴中的可溶性蛋白含量分析  
Tab.1 Analysis of the hemolymph protein content in the of *H. assulta* in different age

蛹的类型 Pupa type	可溶性蛋白含量/(mg · mL <sup>-1</sup> )		
	滞育型 Diapause	非滞育型 Non - diapause	<i>t</i> 测验 <i>t</i> - test
预蛹 Prepupa	36.68 ± 1.25	26.25 ± 0.03	11.77**
2 日龄蛹 雌 Female	26.07 ± 0.32	26.38 ± 0.77	0.31
2 - day pupa 雄 Male	29.36 ± 1.12	19.57 ± 0.58	10.95**
<i>t</i> 测验 <i>t</i> - test	3.93**	9.87**	—
5 日龄蛹 雌 Female	19.70 ± 2.18	35.07 ± 1.86	7.56**
5 - day pupa 雄 Male	25.82 ± 1.76	31.02 ± 1.67	3.03**
<i>t</i> 测验 <i>t</i> - test	3.08**	2.29*	—
9 日龄蛹 雌 Female	24.57 ± 1.34	5.50 ± 0.42	19.19**
9 - day pupa 雄 Male	14.61 ± 1.70	8.79 ± 0.77	4.35**
<i>t</i> 测验 <i>t</i> - test	6.31**	6.02**	—

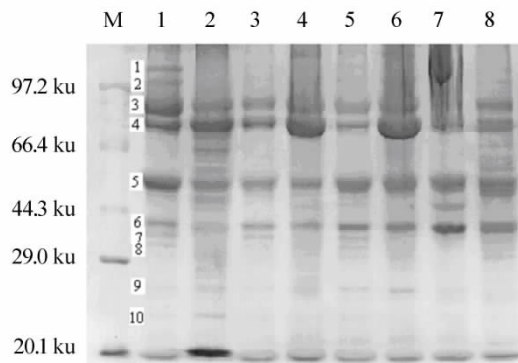
最后一栏 *t* 测验指同一行中滞育蛹与非滞育蛹间的差异; 其他 *t* 测验指同一列同日龄的雌、雄个体间的差异。\* 和 \*\* 分别表示 5% 和 1% 水平的差异显著性。

*t* - Test in the last column indicate the difference between the diapause and non - diapause pupae in the same line , the others indicate the difference between female and male pupae in same column and same pupae age. \* and \*\* show the significance at 5% and 1% level. respectively.

由表 1 可以看出, 在滞育与非滞育差异分析中, 除 2 日龄雌蛹的滞育个体与非滞育个体蛋白含量没有差异外, 其它时期不管雌虫间还是雄虫间均有极显著差异; 从雌雄个体间的蛋白含量可以看出, 5 日龄非滞育蛹雌、雄个体间存在显著差异, 其它时期不管是滞育蛹还是非滞育蛹, 其雌、雄个体间均存在极显著差异。

从预蛹到 9 日龄蛹这一阶段, 滞育蛹和非滞育蛹血淋巴中蛋白含量的变化很复杂。在预蛹时, 滞育蛹蛋白含量高于非滞育蛹, 在随后的 2 ~ 3 d 内, 不论是滞育还是非滞育个体, 血淋巴中的蛋白含量都呈降低趋势, 比较特殊的是非滞育的雌蛹含量略有升高。在 2 日龄到 5 日龄期间, 滞育蛹血淋巴蛋白含量继续降低, 而非滞育蛹的血淋巴蛋白含量却开始升高。5 日龄到 9 日龄的 4 d 内, 滞育雌蛹血淋巴蛋白含量略有回升, 滞育雄蛹则仍持续降低, 同时, 非滞育蛹也开始迅速降低, 且降低速度要快于滞育态。到 9 日龄时, 非滞育蛹的血淋巴蛋白含量要显著低于滞育态。

在整个血淋巴蛋白含量的变化过程中, 非滞育个体从化蛹至羽化前呈现出“降低—升高—降低”的变化趋势, 在 5 日龄时出现最大值, 此时血淋巴蛋白含量达到 31.02 ~ 35.07 mg/mL, 而滞育个体化蛹后血淋巴蛋白含量持续降低, 含量最高值出现在预蛹阶段。



M: 标准蛋白; 1: 预蛹期非滞育蛹; 2: 预蛹期滞育蛹; 3: 2 日龄非滞育蛹; 4: 2 日龄滞育蛹; 5: 5 日龄非滞育蛹; 6: 5 日龄滞育蛹; 7: 9 日龄非滞育蛹; 8: 9 日龄滞育蛹。

M: Standard protein; 1: Non - diapause prepupa; 2: Diapause prepupa; 3: 2 - day non - diapause pupa; 4: 2 - day diapause pupa; 5: 5 - day non - diapause pupa; 6: 5 - day diapause pupa; 7: 9 - day non - diapause pupa; 8: 9 - day diapause pupa.

图 1 烟夜蛾滞育蛹和非滞育蛹血淋巴蛋白图谱

Fig. 1 Electrophoretograms of SDS - PAGE for the hemolymph protein in the diapause and non - diapause pupae of *H. assulta*

## 2.2 烟夜蛾蛹血淋巴的可溶性蛋白质图谱

为了比较烟夜蛾滞育蛹和非滞育蛹血淋巴中的蛋白含量及组成有无差异,本研究采用 SDS-PAGE 法进行了蛋白质电泳(图 1)。

由图 1 可以看出,烟夜蛾滞育蛹与非滞育蛹血淋巴中蛋白组成存在明显差异。非滞育的预蛹第 1 和第 2 条带明显,而滞育预蛹则缺乏该条带。滞育蛹与非滞育蛹蛋白最明显的差异表现在第 3 和第 4 条带。预蛹时,非滞育个体的第 3 条带比滞育个体的明显加粗,说明前者该蛋白含量较高,但无论是滞育预蛹还是滞育蛹,其第 4 条带均比非滞育个体的显著加深、加粗,说明该蛋白含量在滞育个体中显著增加。第 5 条带也有明显的特异性,预蛹时非滞育蛹比滞育蛹含量高,化蛹初期(2 日龄)含量降低,此后又开始逐渐升高,但滞育蛹与非滞育蛹间差别不大。

## 3 讨 论

由烟夜蛾滞育蛹与非滞育蛹血淋巴蛋白质的分析结果可以看出,滞育蛹血淋巴蛋白含量在预蛹期达到最高,此后开始下降,这与王方海等<sup>[7]</sup>对棉铃虫的研究结果相同,但棉铃虫非滞育个体化蛹后血淋巴蛋白含量逐渐降低,这与本研究中烟夜蛾 5 日龄非滞育蛹可溶性蛋白含量较高不同。笔者此前曾研究了烟夜蛾预蛹至 5 日龄蛹期间雌、雄蛹混合血淋巴蛋白含量的变化,发现此间滞育个体与非滞育个体蛋白含量无显著差异<sup>[12]</sup>。考虑到烟夜蛾正常条件下的蛹期为 10 d 左右,而此前研究内容只到 5 日龄为止,且未区分雌、雄蛹,为此本研究对雌、雄蛹分别进行了补充研究,结果发现雌、雄蛹个体间可溶性蛋白含量差异显著。本研究中 5 日龄非滞育蛹可溶性蛋白含量明显高于 2 日龄蛹和预蛹,与此前的研究结果有差异<sup>[13]</sup>,这种差异是由雌、雄蛹个体差异造成的,还是有其他原因,有待进一步研究。

蛋白质是昆虫滞育期间的主要抗寒物质之一<sup>[13-14]</sup>。在滞育的预蛹阶段,血淋巴蛋白含量较高,表明蛹体内物质在累积;之后逐渐下降,说明变态过程和滞育过程物质在消耗;后又略有上升,这可能与此时体内的脂肪向蛋白转化有关。笔者对滞育蛹虫体内总蛋白含量的研究表明,从 5 日龄以后滞育蛹虫体的蛋白含量逐渐升高,很有可能与抗寒有关的蛋白也存在于虫体组织内而完全在非血淋巴中,因为在自然界烟夜蛾滞育蛹要经历近 7 个月的滞育期,昆虫要为期间的抗寒做好准备。

昆虫血淋巴中含有的可溶性蛋白主要包括载体蛋白(如保幼激素结合蛋白、脂结合蛋白等)、储存蛋白和一些酶类,如海藻糖酶、保幼激素酯酶、原酚氧化酶和酚氧化酶等<sup>[15]</sup>。应用电泳方法对血淋巴中蛋白进行分析和鉴定是较为快捷简便的一种途径。从烟夜蛾滞育蛹与非滞育蛹蛋白质电泳结果中也可以看出,预蛹期非滞育个体比滞育个体的蛋白质种类多,滞育期间多数时期蛋白质种类和含量明显多于非滞育蛹,这与易传辉等<sup>[16]</sup>对美凤蝶的研究结果相同。随日龄增加,滞育蛹蛋白质含量增多,其中可能存在 DAP。DAP 在虫体内的作用可能有 2 种,一是作为储藏蛋白在滞育期间直接提供能源,二是作为抗冻蛋白降低体液的过冷点<sup>[17]</sup>。9 日龄时,蛋白含量有减少,可能是在滞育过程中血淋巴内部分蛋白转化为氨基酸,以此增加血淋巴的渗透压提高抗寒性。

本研究对烟夜蛾 9 日龄前的蛹进行了蛋白质电泳图谱研究,发现滞育蛹和非滞育蛹可溶性蛋白含量和种类存在差异,今后需进一步研究整个滞育期间可溶性蛋白的变化,同时分析非滞育蛹与滞育蛹的差异蛋白的种类及其生理功能,以对分析昆虫烟夜蛾滞育的生理生化机制提供更充分的依据。

### 参考文献:

- [1] 郭线茹,王冬燕,李为争,等. 烟夜蛾滞育蛹和非滞育蛹氨基酸含量的比较研究[J]. 河南农业大学学报, 2009, 43(2): 191-195.
- [2] 华爱,薛芳森,朱杏芬. 环境因素对昆虫滞育诱导的影响[J]. 江西农业大学学报, 2002, 24(4): 431-435.
- [3] 涂小云,匡先钜,徐婧,等. 昆虫滞育的遗传性[J]. 江西农业大学学报, 2009, 31(5): 858-861.
- [4] 王智渝,胡敦孝,王宗舜. 棉铃虫滞育蛹和非滞育蛹血淋巴某些生化特性的比较研究[J]. 中国农业大学学报, 1998, 3(1): 33-39.
- [5] 郭线茹,高玉红,罗梅浩,等. 烟夜蛾(*Helicoverpa assulta*) 滞育蛹和非滞育蛹的耐寒性[J]. 昆虫知识, 2006, 43(2): 184-186.
- [6] Joplin K H, Yocum G D, Denlinger D L. Diapause specific proteins expressed by the brain during the pupal diapause of the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis* [J]. Journal of Insect Physiology, 1990, 36(10): 775-783.

(下转第 323 页)

- [2]朱锦懋,黄茂提,陈由强等.笋材两用毛竹林林分结构数量关系研究[J].植物生态学报,2000,24(4):483-488.
- [3]何东进,洪伟,吴承祯.毛竹林林分平均胸径模拟预测模型的研究[J].林业科学,2000,36(1):149-151.
- [4]洪伟,郑郁善,邱尔发.毛竹丰产林密度效应研究[J].林业科学,1998,34(1):1-4.
- [5]郑郁善,洪伟.毛竹林丰产年龄结构模型与应用研究[J].林业科学,1998,34(3):1-6.
- [6]郑郁善,洪伟,陈礼光.竹林合理经营密度的研究[J].林业科学,1998,34(1):6-9.
- [7]唐守正.多元统计分析[J].北京:中国林业出版社,1986:20-36,61-89.
- [8]徐道旺.毛环竹笋用林丰产结构的研究[J].竹子研究汇刊,2004,23(2):35-37.
- [9]郑郁善.毛竹材用丰产林密度效应模型研究[J].生物数学报,1997,12(3):280-281.
- [10]陈双林,陈长远,杨清平等.麻竹笋用林林分结构优化模式研究[J].江西农业大学学报,2005,27(2):192-193.
- [11]苏文会,顾小平,宫凤英等.大木竹种群生物量结构及其回归模型[J].南京林业大学学报,2006,30(5):51-54.
- [12]廖军,张卫栋,薛建辉等.竹阔混交林混交类型的综合评价[J].江西农业大学学报,2002,24(3):346-348.
- [13]刘广路,范少辉,宫凤英等.不同年龄毛竹营养器官主要养分元素分布及与土壤环境的关系[J].林业科学研究,2010,23(2):252-254.
- [14]张刚华.不同林分毛竹林结构特征与植物物种多样性研究[D].北京:中国林业科学院亚热带林业研究所,2006:18-38.
- [15]苏文会,顾小平.大木竹秆形结构的研究[J].林业科学研究,2006,19(1):98-101.
- [16]吕久儒.试论河南竹产业的发展[J].地域研究与开发,1999,19(3):59-61.
- [17]毋存俭,毋爱霞.北方斑竹生长规律及丰产管理技术[J].竹子研究汇刊,2005,24(3):15-18.
- [18]徐泳,刘道敏.博爱竹林的历史与现状[J].竹子研究汇刊,2004,4:51-53.
- [19]郑蓉,陈开益,郭志坚等.不同海拔毛竹林生长与均匀度整齐度的研究[J].江西农业大学学报,2011,23(2):236-239.
- [20]李国庆.《河南省主要竹林群体结构与丰产栽培技术模式》成果荐述[J].竹子研究汇刊,1992,11(1):43-44.

(上接第 297 页)

- [7]王方海,龚和,欽俊德.滞育和非滞育棉铃虫血淋巴中蛋白质含量及图谱的比较[J].昆虫学报,1998,41(4):426-430.
- [8]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[J]. Journal of Insect Physiology, 1996, 42(5):423-431.
- [9]成卫宁,李怡萍,李建军等.小麦吸浆虫滞育前后和滞育期蛋白质含量及其电泳分析[J].植物保护学报,2008,35(2):55-59.
- [10]郭鄂,折介六.昆虫学实验技术[M].北京:科学出版社,1988.
- [11]何忠效.生物化学实验技术[M].北京:化学工业出版社,2004.
- [12]高玉红,郭线茹,罗梅浩等.烟实夜蛾滞育蛹和非滞育蛹生化特性的比较研究[J].河南农业大学学报,2006,40(6):627-629,645.
- [13]韩瑞东,孙绪良,许永玉等.赤松毛虫越冬幼虫生化物质变化与抗寒性的关系[J].生态学报,2005,25(6):1352-1356.
- [14]陈永杰,孙绪良.桑螟越冬幼虫体内蛋白质、氨基酸、碳水化合物的变化与抗寒性的关系[J].蚕业科学,2005,31(2):111-115.
- [15]罗克斯坦 M. 昆虫生物化学[M].北京:科学出版社,1988:77-78.
- [16]易传辉,陈晓鸣,史军义等.美凤蝶滞育期间水溶性蛋白的初步研究[J].云南农业大学学报,2011,26(2):205-210.
- [17]田华,王莉.昆虫蛋白类功能成分研究进展[J].河南农业科学,2011,40(4):22-26.