

七星瓢虫卵黄蛋白的理化性质

龚 和 张 建 中 翟 启 慧

(中国科学院动物研究所)

摘要 本文报道七星瓢虫 *Coccinella septempunctata* 卵黄蛋白的物理、化学性质。卵黄蛋白从成熟卵中用 0.4M NaCl 溶液提取时离子强度是提取的关键因素, pH 影响不大。以聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)后染色证明卵黄蛋白是糖脂复合蛋白。电泳和免疫反应证明脂肪体和血淋巴中具有与卵内卵黄蛋白同源的蛋白带。化学分析表明卵黄蛋白含脂量为 17.86%, 含糖量为 7.56%。氨基酸组份分析表明天门冬氨酸、谷氨酸(包括相应的酰胺)等含量较高, 含硫氨基酸含量很低。卵黄蛋白的沉降系数为 14S, 分子量测定为 280,000—300,000 道尔顿。卵黄蛋白分子经 SDS-PAGE 表明由四个亚基组成。亚基分子量分别为 140,000, 125,000, 410,00, 400,00 道尔顿。卵黄蛋白的等电点为 pH 7.0—7.4。

昆虫卵黄发生(vitellogenesis)机理和控制的研究是当前昆虫生理学和生物化学最活跃的领域之一(Engelmann; 1980; Hagedorn; 1979; 龚和等, 1979)。卵黄蛋白常为雌性个体所特有, 来源集中、易分离纯化, 可为深入研究大分子生物合成和激素在分子水平上的作用作为模式系统(Tata, 1979)。

卵黄蛋白在脂肪体内合成, 释放到血淋巴中再被发育的卵母细胞选择性地摄取。这个过程受激素调节。从合成到积累要经过一系列的修饰过程, 在血淋巴中其前体称为卵黄原蛋白* (vitellogenin), 积累在卵母细胞中称为卵黄蛋白(vitellin)。今对昆虫这二种蛋白在理化性质方面的异同以及这一分子的修饰过程已进行了广泛的研究(Thomas, 1979; Chen, 1978)。

查明卵黄蛋白的理化性质是深入研究昆虫卵黄发生及其调节控制的重要步骤。近年来已对飞蝗(Gellissen 等, 1976; Chen 等 1978)、蚌螭(Dejmal 和 Brookes, 1972; Engelmann 等, 1976)、天蚕蛾(Kunkel 和 Pan, 1976)、蓖麻蚕(Chino 等, 1976、1977)、埃及伊蚊(Hagedorn 等; Judson, 1972)等昆虫的卵黄原蛋白或卵黄蛋白有过详细的报道。

七星瓢虫是一种捕食性昆虫, 我们近来对它的食性营养和生殖关系, 以及激素与营养因子对卵黄形成的影响已进行了研究(动物研究所等, 1977; 陈志辉等, 1980; 龚和等, 1980)。

本文报道七星瓢虫成熟卵中卵黄蛋白的分离及其物理化学性质。

材 料 和 方 法

1. 卵黄蛋白的制备 七星瓢虫的成熟卵用 0.4 M NaCl 溶液提取, 经冷重蒸水沉淀两

本文于 1980 年 9 月收到。

* Vitellogenin = Yolk Protein precursor, 称为卵黄原蛋白, 简称 Vg。Vitelmin = Yolk Protein, 在高等动物中称为卵黄磷蛋白, 在昆虫中称为卵黄蛋白, 简称 Vn。

次后,用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 鉴定没有杂蛋白带,提纯的样品冷冻干燥后备用 (龚和等, 1980)。

2. 电泳 普通盘状电泳的凝胶浓度 (T) 为 5% 和 7.5%, 电极缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液, $\text{pH} = 8.3$, 蛋白用考马斯亮蓝 (coomassie brilliant blue R-250) 染色, 脂蛋白用苏丹黑 (sudan black) 预染, 糖蛋白用过碘酸-Schiff 试剂染色 (Maurer, 1971), 磷蛋白用甲基绿染色 (Cutting 和 Roth, 1973)。

等电点电泳 40% 载体两性电解质 ($\text{pH}: 3-10$) (Ampholine LKB, 瑞典) 在凝胶中占 2.5%。样品混合在凝胶中, 每个管含 50 微克蛋白, 阳极用 0.2% H_2SO_4 , 阴极用 0.4% 乙醇胺。总电流恒定在 2 毫安 (2mA), 4 小时后电泳结束。部分凝胶在 10% 三氯乙酸 65°C 固定 30 分钟, 用 0.2% 考马斯亮蓝:乙醇:冰乙酸 (45:45:10) 混合液在 65°C 染色 30 分钟, 用乙醇:水:冰乙酸 (25:65:10) 液脱色。未染色凝胶切成 2.5—3 毫米的小片, 每片用 2 毫升重蒸馏水浸泡, 测定 pH 值。

SDS 凝胶电泳 用垂直板状电泳仪。凝胶浓度 (T) 7.5%, 交联度 (C) 2.7%, 阳极缓冲液: 1000 毫升中含 40mM Tris, 1N HCl 30 毫升, 20mM 乙酸钠, 2mM EDTA-二钠。阴极缓冲液: 即在阳极缓冲液中加入 SDS (十二烷基磺酸钠, 英国 BDH 出品) 使达 0.1%。样品解离液: 含 2% SDS, 10% 蔗糖, 2mM EDTA, 5% 巯基乙醇。样品处理: 样品液和解离液按 1:1 混和后在沸水浴中加热 2 分钟。电泳条件: 预电泳在 30mA 30 分钟, 加样后电流加到 40mA。凝胶用考马斯亮蓝染色液 (1.25 克考马斯亮蓝、227 毫升水、227 毫升甲醇、46 毫升冰乙酸) 染色 15 分钟, 用脱色液 (875 毫升水、75 毫升冰乙酸、50 毫升甲醇) 脱色。

不同浓度的聚丙烯酰胺凝胶电泳 用垂直板状电泳仪。分别用 5%、7.5%、10% 凝胶浓度对已知分子量的蛋白和样品进行电泳, 根据分子量对数和已知分子量蛋白在不同浓度凝胶中的迁移率的比值作图。

3. 化学分析 脂类的定量分析 冷冻干燥的卵黄蛋白 2—5 毫克准确称重后用脱脂滤纸包好。在氯仿、甲醇 (2:1) 提取液在微型的脂肪抽提器中 60°C 抽提 4 小时, 溶剂在恒重的称量瓶中挥发干燥后称重。

糖的测定 用蒽酮反应测定中性己糖的总量, 用甘露糖作标准, 在 620m μ 测定光密度。

磷的测定: 样品用过氯酸消化, 生成的无机磷与 5% 钼酸铵反应生成磷钼酸, 再用还原试剂还原后用 660m μ 测光密度, 用 1mM KH_2PO_4 作标准。

蛋白质的测定 按 Lowry 氏法 (1951) 测定, 用牛血清白蛋白作标准。

氨基酸组份分析 卵黄蛋白经脱脂后, 用 6N HCl 在 110°C 水解 24 小时, 水解在密封的厚质玻璃安培管中进行, 样品用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪测定。

4. 沉降系数测定 每毫升 0.4M NaCl 溶液 ($\text{pH} = 7$) 中含卵黄蛋白 5 毫克, 测定仪为日立 UCA-1A 型分析超速离心机。

5. Sepharose 6B 柱层析 Sepharose 6B (瑞典 Pharmacia 公司出品) 柱体积为 1.20cm \times 90cm。平衡缓冲液为 0.05M Tris-HCl, 含 0.1M KCl, $\text{pH} = 8.0$, 流速 12 毫升/小时, 外水体积 (V_0) 42 毫升 (用蓝色葡聚糖 2000 测定)。

结果和讨论

1. 卵黄蛋白的分离和溶解特点 从七星瓢虫成熟卵中用 0.4M NaCl 溶液初步提取后再用蒸馏水沉淀法可取得电泳纯的卵黄蛋白, 一般每克成熟卵经二次沉淀可得到卵黄蛋白 50 毫克左右(刚产出的卵可得到 100 多毫克)。Dejmal (1968)证明 NaCl 溶液的离子强度是蚌蠊卵黄蛋白溶解的关键因素。Oie (1975) 和 Gellissen (1976) 又指出缓冲液的 pH 也是重要因素。我们分别用不同离子强度的 NaCl 溶液和不同 pH 的缓冲液提取卵黄蛋白, 结果表明离子强度是关键。在低离子强度下, pH 梯度从 5.4—9.0 所得的卵黄蛋白甚微, 对离子强度则很敏感, 超过 0.1M 就可以溶解, 最适条件在 0.6—0.8M, 超过 2M 溶解才有所下降(图 1)。

用等电聚焦电泳方法测定其等电点为 pH7.0—7.4。在等电聚焦电泳中卵黄蛋白分成均等的三条带, 各条带的等电点依次为 pH7.1, 7.3, 7.4 (图 2)。在免疫电泳中三条带均能同抗体起交差反应。为什么被分成等电点很相近的三条带还不清楚。

2. 卵黄蛋白的电泳性质 卵黄蛋白在 5% 的盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳中的迁移率为 0.25, 在 7.5% 的盘状电泳中为 0.13。用过碘酸-Schiff 试剂染色反应呈阳性, 证明它是一种糖蛋白。用苏丹黑预染后电泳证明它是一种脂蛋白, 所以染色反应表明卵黄蛋白是一种糖脂复合蛋白。磷蛋白染色反应呈阴性, 表明卵黄蛋白并非是磷蛋白或含量甚微。脊椎动物卵黄蛋白和昆虫卵黄蛋白在理化特性上的最大区别在于含磷量。脊椎动物卵黄蛋白是磷蛋白, 所以称为卵黄磷蛋白。

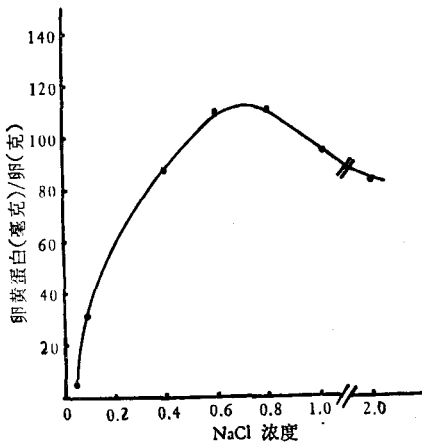


图 1 卵黄蛋白在不同离子强度 NaCl 溶液中溶解能力(用成熟卵中提取卵黄蛋白的量表示)

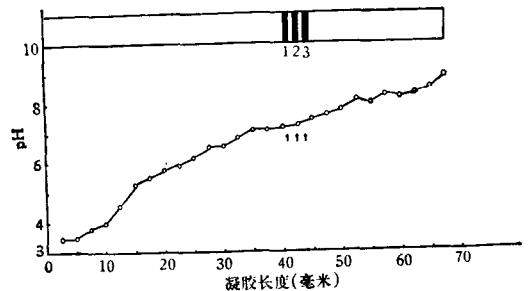


图 2 卵黄蛋白在 5% PAGE、2.5% Ampholine (pH3—10) 的等电聚焦电泳图

上方为凝胶条中三条蛋白带位置

下方为凝胶条中 pH 值分布情况, 箭头表示卵黄蛋白 1、2、3 的 pH 值。

在生殖期雌虫的血淋巴、脂肪体和卵巢组织蛋白提取液电泳中, 均出现与卵中的卵黄蛋白迁移率相同的带, 而雄虫与刚羽化雌虫中则没有这一蛋白带。免疫反应也证明生殖期雌虫的血淋巴、脂肪体和卵巢的可溶性蛋白同卵黄蛋白抗体交差反应, 同样雄虫和刚羽化雌虫没有这一反应。这些说明了脂肪体、血淋巴中这一蛋白与卵中卵黄蛋白是同源的, 是卵黄蛋白的前体分子。

3. 化学分析 昆虫的卵黄蛋白是成份复杂的大分子, 一般昆虫的卵黄蛋白含脂量在

10% 左右,而德国小蠊中血淋巴卵黄原蛋白含脂量可高达 15.7%。七星瓢虫卵黄蛋白的含脂量为 17.86%,含脂量较高,除为其本身的固有特性外,所提取的脂类没有纯化可能也是脂类偏高的原因之一。脂类测定含磷量为 3.28%,经硅胶 G 薄层层析证明其主要成份为磷脂酰胆碱、中性脂、胆固醇。磷脂是卵黄蛋白脂类中的主要成份。

已知各种昆虫卵黄蛋白含碳水化合物量变化幅度较大,在 1%—12% 之间。七星瓢虫卵黄蛋白含碳水化合物 7.56%。含碳水化合物是昆虫卵黄蛋白的重要特点,据分析碳水化合物主要是甘露糖、氨基葡萄糖、唾液酸等。脊椎动物的卵黄蛋白一般不含有碳水化合物。七星瓢虫的卵黄蛋白经纯化和冷冻干燥后呈黄色,估计含有丰富的类胡萝卜素。

氨基酸组份分析:卵黄蛋白的氨基酸组份分析结果见表 1,表 1 说明七星瓢虫卵黄蛋白的氨基酸组份同其他昆虫的卵黄原蛋白、卵黄蛋白的氨基酸组份十分相近。其中天门冬氨酸、谷氨酸(包括相应的酰胺)、丝氨酸、亮氨酸、赖氨酸的含量较高,而含硫氨基酸—甲硫氨酸、半胱氨酸含量较低,组氨酸含量也较低。

表 1 昆虫卵黄蛋白的氨基酸组份*

	七星瓢虫	德国蚌蠊	飞 蝗	天 蚕 蛾	马铃薯甲虫
天门冬氨酸	8.77	12.18	11.13	9.68	9.97
苏 氨 酸	4.63	5.97	4.82	5.15	5.54
丝 氨 酸	6.85	9.55	7.57	9.24	9.70
谷 氨 酸	11.44	10.97	12.71	14.32	12.81
脯 氨 酸	3.33	4.47	6.03	4.42	5.19
甘 氨 酸	4.63	3.07	5.10	4.39	5.17
丙 氨 酸	4.42	4.92	8.46	7.50	5.50
缬 氨 酸	6.17	7.75	7.81	5.59	6.84
甲硫氨酸	1.72	2.82	1.70	1.96	2.52
异亮氨酸	4.61	4.74	5.10	4.45	5.68
亮 氨 酸	6.48	8.69	10.24	6.02	7.05
酪 氨 酸	4.11	4.89	5.06	5.16	3.78
苯 丙 氨 酸	3.55	4.49	2.95	3.47	4.72
赖 氨 酸	8.11	7.06	5.71	7.55	7.75
组 氨 酸	2.63	4.14	1.58	3.14	2.90
NH ₃	11.18	14.54	—	15.17	—
精 氨 酸	3.86	1.27	4.05	7.94	5.01
半胱氨酸	0.60	0.86	1.01	—	—
色 氨 酸		0.79	2.19	0.62	—

* 除七星瓢虫外,均摘自 Kunkel 和 Pan (1976)

Kunkel 和 Pan (1976) 把德国蚌蠊的卵黄原蛋白、血清蛋白 I、II, 五种昆虫、二种两栖类的卵黄磷蛋白、卵黄原蛋白的氨基酸组份进行了比较,它们都是相似的。但卵母细胞对卵黄蛋白的摄取选择性很强。不但在多种血蛋白中选择摄取卵黄蛋白,而且选择性地摄取本种或近缘种的卵黄蛋白。用东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis*、柞蚕 *Antheraea pernyi*、异色瓢虫 *Leis axyridis*、双带盘瓢虫 *Coelophora biplagiata*、大突肩瓢虫 *Synonycha grandis*、月唇瓢虫 *Chilomenes* 的卵匀浆液与七星瓢虫卵黄蛋白的抗血清进行免疫扩散都没有交差反应。这表明尽管各种昆虫卵黄蛋白的组份极其相近,但免疫反应证明它们的氨

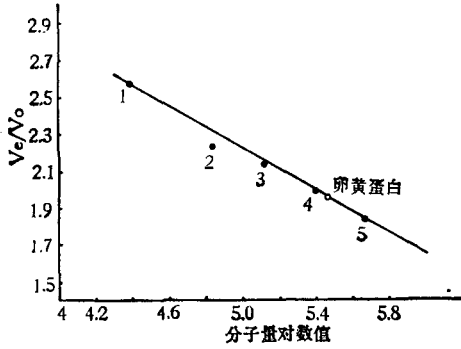


图3 Sepharose 6B 柱层析测定卵黄蛋白分子量

- 1. 胰凝乳蛋白酶原 A(2.5 万)
- 2. 清蛋白(6.8 万)
- 3. 醛缩酶 (15.8 万), 4. 过氧化酶 (24万)
- 5. 铁蛋白 (45 万)

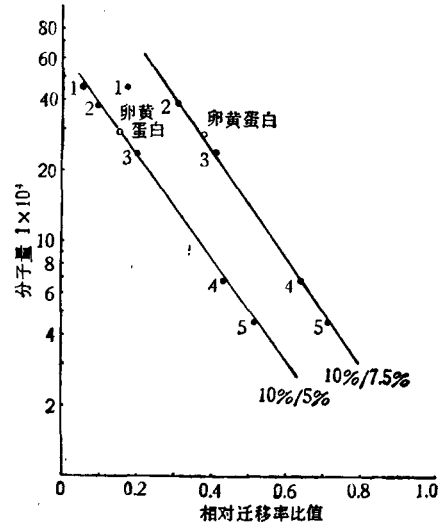


图4 蛋白质分子量与不同凝胶浓度的相对迁移率比值间的关系

- 1. 铁蛋白 (450,000) 2. ATP 酶 (390,000—400,000) 3. 过氧化酶 (240,000) 4. 清蛋白 (68,000) 5. 清蛋白 (45,000)

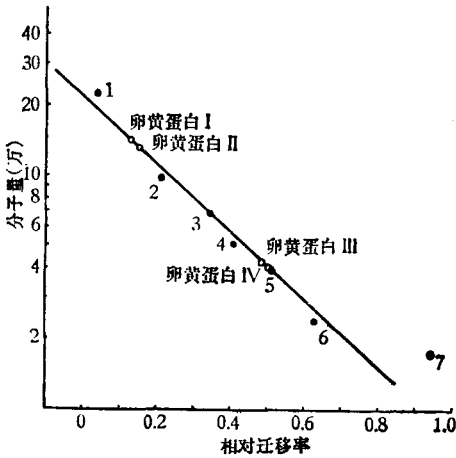


图5 卵黄蛋白亚单位分子量测定 (7.5%SDS-PAGE)

- 1. 肌球蛋白 (22 万) 2. 磷酸化酶 (9.4 万) 3. 清蛋白 (6.8 万) 4. r-球蛋白重链 (5.0 万) 5. 醛缩酶 (3.95 万) 6. r-球蛋白轻链 (2.35 万) 7. 细胞色素 C (1.25 万)

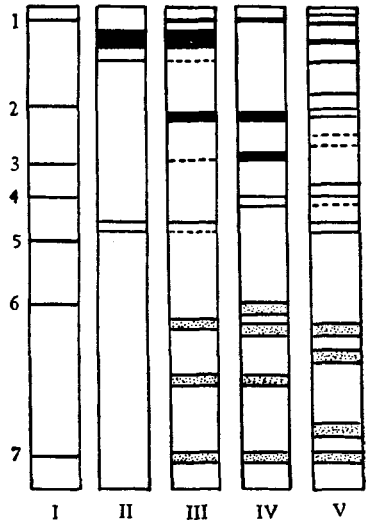


图6 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

- I. 7 种已知亚基分子量蛋白 1. 肌球蛋白 (22 万) 2. 磷酸化酶 (9.4 万) 3. 清蛋白 (6.8 万) 4. r-球蛋白重链 (5.0 万) 5. 醛缩酶 (3.95 万) 6. r-球蛋白轻链 (2.35 万) 7. 细胞色素 C (1.25 万)
- II. 卵黄蛋白 III. 雌瓢虫血淋巴 IV. 雄瓢虫血淋巴 V. 雌瓢虫脂肪体

氨基酸顺序有差异,因而普遍认为卵母细胞识别和选择卵黄蛋白的机理在于卵黄蛋白分子一级结构的差异。

4. 卵黄蛋白的分子量、沉降系数和亚基结构 分别用 Sepharose 6B 柱层析和凝胶电泳方法测定七星瓢虫卵黄蛋白的分子量为 280,000—300,000 道尔顿(图 3、4)。凝胶电泳则用已知分子量的标准蛋白和样品在 5%、7.5%、10% 浓度的聚丙烯酰胺凝胶上迁移率的比值和分子量的对数关系作图求出样品分子量。Sepharose 6B 柱层析则根据洗脱体积 V_e 和外水体积 V_0 的比值与分子量的对数值作图求出样品分子量。

大部分昆虫的卵黄蛋白分子量在 5×10^5 左右,埃及伊蚊的卵黄蛋白分子量只有 2.7×10^5 。在已知分子量的卵黄蛋白中七星瓢虫卵黄蛋白的分子量是比较小的,其偏小的原因还可能是样品制备过程中在蛋白水解酶作用下样品已初步降解。此外,碱性条件下电泳也容易引起样品降解。

七星瓢虫卵黄蛋白经 SDS 和 β -巯基乙醇处理在 SDS-凝胶电泳上明显分成四个多肽链,它们的分子量分别为 1.4×10^5 , 1.25×10^5 , 4.1×10^4 , 4×10^4 (图 5)。生殖期雌虫血淋巴和脂肪体提取液在 SDS-凝胶电泳中显示出和卵黄蛋白分子亚单位相同的蛋白带。可见,在脂肪体中合成的卵黄蛋白前体分子 vitellogenin 以及释放到血淋巴中后都与卵内的卵黄蛋白具有相同的亚单位(图 6)。至于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等则需通过离体条件下标记合成和化学算法来测定。

在 0.4M NaCl 溶液中 (pH = 7) 测定卵黄蛋白的沉降系数为 14S,其在卵内是否以 14S 的形式沉积还不清楚。蜚蠊卵黄蛋白的沉降系数分析证明: 14S 的卵黄蛋白前体分子在卵母细胞中最终以 28S 的三聚体形式出现。Koeppel 和 Ofengand (1976a, 1976b) 证明这种 28S 单位是不稳定的,很容易被冰冻或碱性处理不可逆地解聚为 14S。七星瓢虫卵黄蛋白也可能具有同样的特点。

参 考 文 献

- 动物研究所昆虫生理室等 1977 七星瓢虫成虫代饲料的研究。昆虫学报 20 (3):243—52。
 龚和、翟启慧 1979 昆虫卵黄原蛋白和卵黄发生。昆虫学报 22 (2) 219—36。
 龚和等 1980 七星瓢虫的卵黄发生: 卵黄原蛋白的发生和取食代饲料的影响。昆虫学报 23 (3) 252—59。
 陈志辉等 1980 食料对七星瓢虫取食和生殖的影响。昆虫学报 23 (2) 141—48。
 Chen, T. T. et al. 1978 Vitellin and Vitellogenin from locusts (*Locusta migratoria*): properties and post-translational modification in the fat body. *J. Biol. Chem.* 253:5324—31.
 Chino, H. et al. 1976 Isolation and characterization of insect vitellogenin. Its identity with haemolymph lipoprotein II. *Biochim. Biophys. Acta.* 441:349—53.
 ———, 1977 Further characterization of lepidopteran vitellogenin from haemolymph and mature eggs. *Insect Biochem.* 7:125—31.
 Cutting, J. A. and T. F. Roth. 1973 Staining of phosphoproteins on acrylamide gel electropherograms. *Analyt. Biochem.* 54: 386—94.
 Dejmál, R. K. and V. J. Brookes. 1968 Solubility and electrophoretic properties of ovarian protein of the cockroach, *Leucophaea maderae*. *J. Insect physiol.* 14:371—81.
 ———, 1972 Chemical and physical characteristics of a yolk protein from the ovaries of *Leucophaea maderae*. *J. Biol. Chem.* 247:869—74.
 Engelmann, F. et al. 1976 The native vitellogenin of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Insect Biochem.* 6:211—21.
 Engelmann, F. 1980 Insect vitellogenin: Identification, biosynthesis and role in vitellogenesis. *Advances in insect physiology.* 14:49—108.

- Gellissen G. et al. 1976 Purification and properties of oocyte vitellin from the migratory locust. *J. Comp. Physiol.* **B108**:287—301.
- Hagedorn, H. H. and C. L. Judson. 1972 Purification and site of synthesis of *Aedes aegypti* yolk protein. *J. Exp. Zool.* **182**:367—78.
- Hagedorn, H. H. and J. G. Kunkel. 1979 Vitellogenin and vitellin in insects. *Ann Rev Entomol.* **24**:475—505.
- Koeppel, J. and J. Ofengand. 1976a Juvenile hormone induced biosynthesis of vitellogenin in *Leucophaea maderae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **173**:100—13.
- , 1976b Juvenile hormone induced biosynthesis of vitellogenin in organ cultures of *Leucophaea maderae* fat bodies. In: *Invertebrate Tissue Culture. Application in Medicine, Biology, and Agriculture.* pp. 185—94. Kurstak, E. and Maramorosch, K. (ed.).
- Kunkel, J. M. and M. L. Pan. 1976 Selectivity of yolk protein uptake: Comparison of vitellogenesis of two insects. *J. Insect physiol.* **22**:809—18.
- Lowry, O. H. et al. 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265—75.
- Oie, M. et al. 1975 Vitellogenin in the eggs of the cockroach, *Blattella germanica*: Purification and characterization. *Development, Growth, Differentiation.* **17**:237—46.
- Marrink, J. and M. Gruber. 1962 Molecular weight determination by chromatography on sepharose 4B. *FEBS. Lett.* **2**:242—44.
- Maurer, H. R. 1971 Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. pp. 32—110.
- Thomas, G. W. et al. 1979 Two processing steps in maturation of vitellogenin polypeptides in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **76**:2848—52.
- Tata, J. A. and D. F. Smith. 1979 Vitellogenesis: A versatile model for hormone regulation of gene expression. *Recent progress in hormone research.* **35**:47—94.

CHARACTERISTICS OF THE YOLK PROTEIN OF *COCCINELLA SEPTEMPUNCTATA* L.

GONG HE ZHANG JIAN-ZHONG ZHAI QI-HUI

(Institute of Zoology, Academia Sinica)

The vitellin of *Coccinella septempunctata* L. has been purified and its chemical and physical properties are studied.

The yolk protein was prepared from the matured eggs by extraction with 0.4 M NaCl and subsequent precipitation in cold distilled water. It is best soluble in the range of 0.1—1.0 M of NaCl solution. The pH of the extractant was not a crucial factor for solubilization of the yolk protein.

The yolk protein was identified as a glycolipoprotein, but it is not a phosphoprotein as shown by specific staining techniques.

The yolk protein contains 17.86% lipids and 7.56% carbohydrate. The amino acid composition shows a high content of aspartic acid, glutamic acid, serine, leucine, lysine and a low percentage of sulphur containing amino acids.

The yolk protein has a sedimentation coefficient $S_{20,w}^0$ of 14S and molecular weight, averaged from gel exclusion chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis, of 280,000—300,000 daltons.

In sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, the yolk protein yield four subunits with molecular weights of 140,000, 125,000, 410,000, 400,000 daltons.