

七星瓢虫的卵黄发生:体外培养的脂肪体中卵黄原蛋白的合成

翟启慧 张建中

(中国科学院动物研究所)

摘要 为了深入研究七星瓢虫的卵黄发生及其激素调节机理,我们建立了脂肪体的体外培养方法,证明了脂肪体在体外培养条件下能够正常进行卵黄原蛋白的合成与分泌。在体外合成的卵黄原蛋白与体内合成的具有相同的电泳迁移率、免疫学特性和部分水解肽谱。放射性氨基酸在体外参入卵黄原蛋白的动力学与在体内的相似。用脂肪体的体外培养方法,结合放射免疫沉淀、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、放射自显影等技术,研究了不同发育期脂肪体的合成能力,以及取食人工饲料的雌虫中保幼激素类似物对卵黄原蛋白合成的促进作用。

关键词 七星瓢虫 卵黄发生 卵黄原蛋白合成 脂肪体 保幼激素类似物

前 言

卵黄原蛋白(vitellogenin, Vg)是卵黄蛋白(vitellin)的前体。在昆虫中,是由成熟雌虫的脂肪体所合成,分泌到血淋巴中,被发育的卵母细胞选择性地摄取,沉积为卵黄蛋白,作为胚胎发育的营养来源(龚和等, 1979; Wyatt 等, 1978; Hagedorn 等, 1979; Engelmann, 1979)。这一卵黄发生(vitellogenesis)过程,是受保幼激素控制的,但在一些双翅目昆虫中,蜕皮激素也参与卵黄发生的调节(Postlethwait 等, 1979; Fuchs 等, 1981; Huybrechts 等, 1981)。

近年来,昆虫 Vg 的研究,不论在生理学、内分泌学、生物化学和分子生物学方面,均有很多新的进展。一方面是由于 Vg 为卵巢成熟所必需,与昆虫繁殖关系密切;另一方面是因为在激素控制下所合成的这种蛋白质具有性别特异性、发育阶段局限性和组织(合成部位)局限性,为研究昆虫激素在分子水平对基因表达的调控机理,提供了一个理想的实验模型。基于上述原因,我们自 1978 年开始,用七星瓢虫 *Coccinella septempunctata* L. 为材料,对卵黄发生和 Vg 进行了一系列研究(龚和等, 1980; 1982 a; 1982b; Zhai 等, 1984)。本文报道七星瓢虫脂肪体在体外培养条件下合成 Vg 的部分研究结果。

材 料 和 方 法

实验昆虫 七星瓢虫采自美国新泽西州和河南安阳的自然种群。在室内用油菜上繁

本文于 1983 年 5 月收到。

本工作的部分实验系翟启慧在美国进修期间进行的。得到明尼苏达大学生化系 J. W. Bodley 教授及俄勒冈大学生物系 J. H. Postlethwait 教授的支持和帮助,特致谢意。

承于延芬同志拍印部分照片,陈瑞瑾同志绘图,一并致谢。

文中缩写: Vg 卵黄原蛋白; SDS-PAGE SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

殖的桃蚜 *Myzus persicae* 饲养,或用人工饲料喂养。人工饲料的配方为鲜猪肝、蜂蜜、蔗糖(5:1:1,重量比)(动物研究所昆虫生理室等,1977)。用人工饲料喂养的瓢虫,在需要时,用合成的保幼激素类似物 ZR-512(美国 Zoecon 公司)处理。将 ZR-512 溶于丙酮,配制成 100 微克/微升的浓度,在每头雌虫的腹部背板上点滴 1 微升。

卵黄蛋白及其抗血清的制备 方法见龚和等(1980)。

V_g 的活体标记 将 ³⁵S-蛋氨酸(> 500 毫居里/毫克分子,英国 Amersham 公司)或 ³H-亮氨酸(52 毫居里/毫克分子,上海原子核所)用七星瓢虫生理盐水[按七星瓢虫血淋巴中无机阳离子成分配成(Florkin 等,1974)]配制成 2 微居里/微升的溶液,由腹部背板节间膜注入 1 微升。一定时间后用毛细管从后腿基部取血淋巴,然后解剖出脂肪体和卵巢,在冷生理盐水中洗净后匀浆。离心后,取出表面脂层下的清液,以备分析。

脂肪体的体外培养 在冷生理盐水中,小心地将脂肪体连同腹部背面表皮解剖出来,摘除气管以外的其他组织,在冷生理盐水中洗 2—3 次后,放在 15 微升含有 1 微居里/微升放射性氨基酸(³⁵S-蛋氨酸或 ³H-亮氨酸)的培养液中。培养液按 Grace(1962) 配制,但减少一种氨基酸(蛋氨酸或亮氨酸)。在 26—28℃ 培养一定时间后,取出脂肪体,在冷生理盐水中洗 2 次,按上述方法制备样品,以备分析细胞内的 V_g。收集培养液,以备分析分泌的 V_g。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 按 Laemmli (1970) 的系统修改,在 5—15% 梯度凝胶板上进行,大小为 30 × 25 cm 或 14 × 16 cm,厚度 0.15 cm。电泳后,多肽用考马斯蓝染色,放射性标记的多肽用放射自显影显示。

免疫沉淀和放射性 V_g 的定量 放射性标记的 V_g 用免疫沉淀方法分离,其方法有两种: 1. 直接免疫沉淀法 将放射性样品中加入适量的卵黄蛋白抗血清(对照加正常兔血清)和 V_g 载体,在 30℃ 水浴中保温 1 小时,在 4℃ 过夜。2. 利用金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 细胞作为吸附剂的免疫沉淀方法,参照 Ivarie 等(1979) 的方法加以修改。用以上两种方法所得到的抗原抗体沉淀,洗净后,进行 SDS-PAGE 和放射自显影。

放射性 V_g 的定量测定采用以下两种方法 1. 将放射自显影底片在光密度计上扫描,并求出 V_g 峰的面积,最大数值折算为 100,结果以 V_g 的相对放射性表示。2. 将抗原抗体沉淀经微孔滤膜过滤和洗净后,用液体闪烁仪计数。减去对照的计数(非特异性结合),结果以 cpm/脂肪体表示。

部分水解的肽谱 按 Cleveland 等(1977) 的方法略加修改,将 SDS-PAGE 分离的 V_g 多肽带从凝胶板上切下,不经洗脱,直接在第二块 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中经金黄色葡萄球菌蛋白酶(Sa V8)部分水解,并进行分离。所产生的肽段,先用 Oakley 等(1980) 的银染色方法染色,然后进行放射自显影。

实 验 结 果

1. 脂肪体在体外和在体内合成的 V_g 的比较

七星瓢虫的 V_g 由四个亚单位组成,其分子量分别为 133,000, 130,000, 46,000, 43,000 (Zhai 等, 1984)。我们首先用 SDS-PAGE 对脂肪体在体外合成的 V_g 进行鉴定。结果表明,七星瓢虫成熟雌虫的脂肪体,在体外培养条件下,能够积极合成 V_g, 并迅

速释放到培养液中。由离体脂肪体所合成和释放的 V_g , 与体内脂肪体、血淋巴中的 V_g 和卵巢中的卵黄蛋白, 在变性条件下, 均分成四个亚单位, 相对应的各个亚单位具有相同的迁移率(图版 I:A)。

体外同位素标记实验的结果表明, 离体脂肪体可将培养液中的放射性氨基酸参入到新合成的 V_g 中。将脂肪体及其培养液中的放射性 V_g , 经过抗体沉淀, SDS-PAGE 分离和放射自显影, 显示出与活体标记的 V_g 一致的结果(图版 I:B)。由此证明, 脂肪体在体外所合成的 V_g , 与在体内合成的 V_g , 具有相同的免疫学特性。

为了进一步鉴定脂肪体在体外所合成的 V_g 在结构上确与体内合成的 V_g 相同, 我们对各亚单位经过部分水解所产生的肽段进行了分析。从图版 I:C 可以看到, 脂肪体培养液中 V_g 的亚单位和血淋巴中 V_g 的亚单位, 经蛋白酶部分水解后, 产生相同的肽段。

这样, 从电泳迁移率、抗原抗体反应特性和部分水解的肽谱三方面的结果, 证明了七星瓢虫雌虫脂肪体在体外培养时所合成和释放的 V_g , 与正常情况下脂肪体在体内所合成、释放至血淋巴中的 V_g , 是完全相同的。

2. 在体外培养的脂肪体中放射性氨基酸参入 V_g 的动力学

为了了解七星瓢虫脂肪体在体外培养条件下放射性氨基酸参入 V_g 的动力学, 我们将成熟雌虫的脂肪体在含放射性氨基酸的培养液中, 培养不同时间后, 分别测定脂肪体和培养液中参入 V_g 的放射性。图 1: a、b 分别表示脂肪体在体外培养第 1 小时内和 1—4

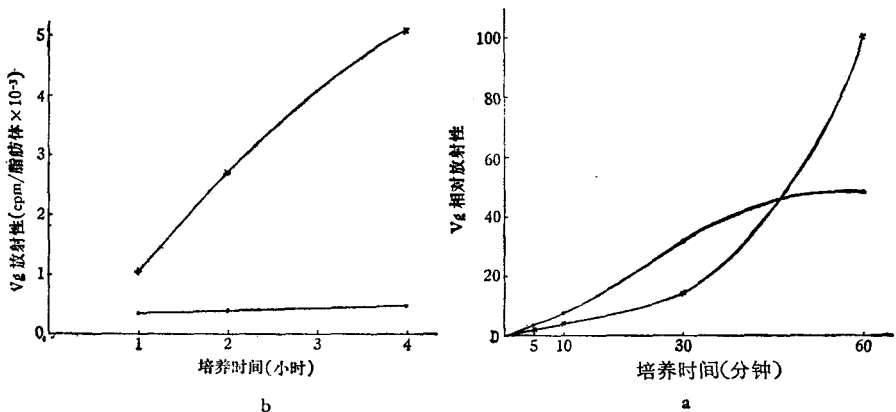


图 1 放射性氨基酸在体外参入 V_g 的动力学

●——● 脂肪体, ×——× 培养液

a. 第 1 小时的参入 b. 1—4 小时的参入

小时的结果。可以看到, 处于卵黄发生盛期的雌虫脂肪体中, V_g 合成的速率很高。培养 5 分钟后, 在脂肪体及其培养液中就都可以测出放射性标记的 V_g 。在 30 分钟时, 细胞内放射性标记的 V_g , 高于培养液中放射性标记的 V_g 。此后, 培养液中放射性 V_g 的水平急剧上升, 到 60 分钟时, 分泌到培养液中的放射性 V_g , 大大超过了保留在脂肪体细胞内的放射性 V_g 。以后, 培养液中放射性的 V_g 继续增加, 而脂肪体细胞内的放射性 V_g , 始终保持在一个低水平。以上结果说明, 脂肪体合成的 V_g , 经过短暂的延滞期, 待细胞内达到一定水平时, 即迅速释放到细胞外。细胞内的 V_g 基本保持稳定。因此, 在 1

小时后, 释放到培养液中 V_g 的量, 可以代表脂肪体所合成 V_g 的量。

为了进行比较, 我们也进行了整体标记实验。图 2 是在活体内放射性氨基酸参入血淋巴中 V_g 的动力学。可以看到, 脂肪体在体外合成与分泌 V_g 的情况, 在 4 小时内, 与在活体内的情况是极其相似的。至于 4 小时后的情况, 根据我们的其它实验结果, 在体内由于卵母细胞对 V_g 的摄取, 血淋巴中放射性 V_g 的水平不再上升(Zhai 等, 1984)。而在体外, 培养液中的放射性 V_g 仍继续增加(待发表资料)。

3. 不同发育期脂肪体的 V_g 合成能力

我们用体外培养方法研究了脂肪体中 V_g 合成能力在卵巢发育不同阶段的变化。我们比较了卵巢处于卵黄发生前期(卵母细胞中尚未沉积卵黄蛋白)、卵黄发生盛期(卵巢充满成熟卵, 即将开始产卵)以及产卵期(已经产过不少卵)的雌虫脂肪体, 在体外合成 V_g 能力的差异。见图版 II:A。图 3 是根据培养液(即图版 II:A 中 2、4、6)中放射性 V_g 的定量测定所绘出的相对合成能力。从这些结果可以看到, 在卵巢发育的不同阶段, 脂肪体合成 V_g 的能力很不相同。在卵母细胞开始摄取 V_g 之前, 脂肪体已有 V_g 的合成, 但是非常微弱。卵巢成熟时, 脂肪体的 V_g 合成速率极高, 是卵黄发生的高峰期。开始产卵之后, 脂肪体的 V_g 合成下降, 但仍保留相当水平, 因而能够保证持续产卵的需要。

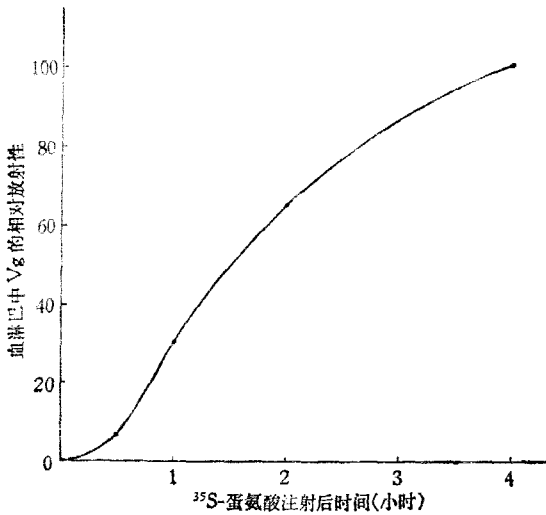


图 2 放射性氨基酸在体内参入血淋巴 V_g 的动力学

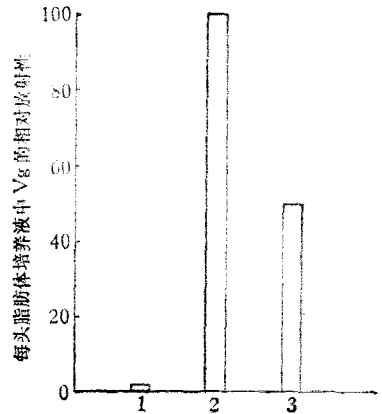


图 3 不同发育期的脂肪体 V_g 合成能力的比较
1. 卵黄发生前期 2. 卵黄发生盛期 3. 产卵期
(1, 2, 3 分别为图版 II:A-2、4、6 的定量结果)

4. 保幼激素类似物对脂肪体 V_g 合成的促进作用

七星瓢虫雌虫取食肝蜜糖人工饲料时, 产卵前期延长, 产卵量少, 而且相当一部分雌虫不产卵, 其卵巢长期停留在卵黄发生前期(动物研究所昆虫生理室等, 1977)。我们将这样不产卵的雌虫的脂肪体进行体外培养, V_g 的合成极弱, 几乎不能测出。这些雌虫经保幼激素类似物 ZR-512 处理后, 大部分个体的卵巢可发育至成熟并产卵。其脂肪体在体外培养时, 表现很强的 V_g 合成。图版 II:B 是 ZR-512 处理前后脂肪体 V_g 合成以及卵巢中卵黄蛋白沉积的对比, 充分显示了保幼激素类似物对脂肪体 V_g 合成的促进作用。

讨 论

脂肪体的体外培养是进行昆虫 Vg 合成及其激素调节的研究中不可缺少的重要技术之一。因为,在体外培养的情况下,不仅细胞结构可以维持完整无损,而且可以充分控制环境条件,细胞产物也可以全部收集。在昆虫体内,脂肪体合成的 Vg,随时释放到血淋巴中,又不断地被发育的卵母细胞所摄取。而脂肪体在体外合成的 Vg,释放后全部积累于培养液中。因此,在一定时间内,培养液中新合成的 Vg 的量,比血淋巴中新合成的 Vg 的量,能更好地反映脂肪体的合成能力。在开展 Vg 研究较早的几种昆虫,如蜉蝣、蝗虫、蚊虫、果蝇中,关于 Vg 合成的规律和激素调节的机理的许多结果,都是通过脂肪体体外培养而取得的(Koepe 等, 1976; Wyatt 等, 1976; Hagedorn 等, 1973; Jowett 等, 1980)。

在七星瓢虫中建立脂肪体体外培养方法则更有必要。因为,七星瓢虫的发育不很整齐,野外采集的成虫一般寄生率较高,这些又无法从外观辨别。在活体标记实验中,往往影响结果,造成浪费。进行 Vg 的体外合成实验时,须先解剖出脂肪体,这样就可以选用发育一致的健康个体的脂肪体,从而保证实验结果准确可靠。此外,七星瓢虫的血淋巴总体积有很大的个体差异,而且不容易取尽。而脂肪体的培养液则可以全部收集。这也是体外培养的优越性之一。

我们用电泳迁移率、抗原性和部分水解产物分析,证明了七星瓢虫脂肪体在体外能够合成真正的 Vg,放射性氨基酸参入脂肪体和培养液 Vg 的动力学也表明体外合成和分泌 Vg 的规律与在完整虫体内是基本一致的。这些充分证明我们所建立的七星瓢虫脂肪体的体外培养系统,能够如实地重复活体内的 Vg 合成。我们正在用体外培养方法对不同发育期脂肪体 Vg 合成的变化,以及保幼激素类似物对 Vg 合成的调节,进行系统的研究。本文仅报道了这两方面的初步结果。

迄今为止,我们在七星瓢虫中关于保幼激素类似物促进 Vg 合成的研究,都是采用整体点滴方法。为了深入研究保幼激素类似物对 Vg 合成的调节,需要在现有的基础上进一步建立脂肪体的长期培养技术,将脂肪体在含保幼激素类似物的培养液中进行长达数天的培养,以便能使保幼激素类似物在体外诱导 Vg 合成。目前,只有在蝗虫中获得这方面的初步成功(Abu-Hakima, 1981)。

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。
龚和等 1982 a 七星瓢虫卵黄蛋白的理化性质。昆虫学报 25(1): 9—15。
龚和等 1982 b 七星瓢虫卵黄原蛋白的合成。动物学集刊 2: 175—81。
Abu-Hakima, R. 1981 Vitellogenin synthesis induced in locust fat body by juvenile hormone analog *in vitro*. *Experientia* 37: 1309—11。
Cleveland, D. W. et al. 1977 Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252: 1102—6。
Engelmann, F. 1979 Insect vitellogenin: Identification, biosynthesis and role in vitellogenesis. *Adv. In-*

- sect Physiol.* **14**: 49—108.
- Florkin, M. and Jeuniaux, C. 1974 Hemolymph: Composition. In: *The Physiology of Insecta*. (M. Rockstein, ed.) 2nd Ed. Vol. 5, p. 271.
- Fuchs, M. S. and Kang, S.-H. 1981 Ecdysone and mosquito vitellogenesis: A critical appraisal. *Insect Biochem.* **11**: 627—33.
- Grace, T. D. C. 1962 Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature* **195**: 788—9.
- Hagedorn, H. H. and Kunkel, J. G. 1979 Vitellogenin and vitellin in insects. *Ann. Rev. Entomol.* **24**: 475—505.
- Hagedorn, H. H. et al. 1973 Vitellogenin synthesis by the fat body of the mosquito *Aedes aegypti*: evidence for transcriptional control. *Dev. Biol.* **31**: 285—94.
- Huybrechts, R. and De Loof, A. 1981 Effect of ecdysterone on vitellogenin concentration in hemolymph of male and female *Sarcophaga bullata*. *Int. J. Invert. Reprod.* **3**: 157—68.
- Ivarie, R. D. and Jones, P. D. 1979 A rapid sensitive assay for specific protein synthesis in cells and in cellfree translation: Use of *Staphylococcus aureus* as an adsorbant for immune complexes. *Anal. Biochem.* **97**: 24—35.
- Jowett, T. and Postlethwait, J. H. 1980 The regulation of yolk polypeptide synthesis in *Drosophila* ovaries and fat body by 20-hydroxyecdysone and a juvenile hormone analogue. *Dev. Biol.* **80**: 225—34.
- Koeppe, J. and Ofengand, J. 1976 Juvenile hormone-induced biosynthesis of vitellogenin in organ culture of *Leucophaea maderae* fat bodies. In: *Invertebrate Tissue Culture* (E. Kurstak and K. Maramorosch, eds.), 185—194.
- Laemmli, U. K. 1970 Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680—5.
- Oakley, B. R. et al. 1980 A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* **105**: 361—3.
- Postlethwait, J. H. and Handler, A. M. 1979 The roles of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone during vitellogenesis in isolated abdomens of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **25**: 455—60.
- Wyatt, G. R. and Pan, M. L. 1978 Insect plasma proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **47**: 779—817.
- Wyatt, G. R. et al. 1976 Juvenile hormone-induced vitellogenin synthesis in locust fat body *in vitro*. In: *Invertebrate Tissue Culture* (E. Kurstak and K. Maramorosch, eds.), 195—202.
- Zhai, Qi-Hui, et al. 1984 Vitellogenin synthesis in the ladybeetle *Coccinella septempunctata*. *Insect Biochem.* **14**: 299—305.

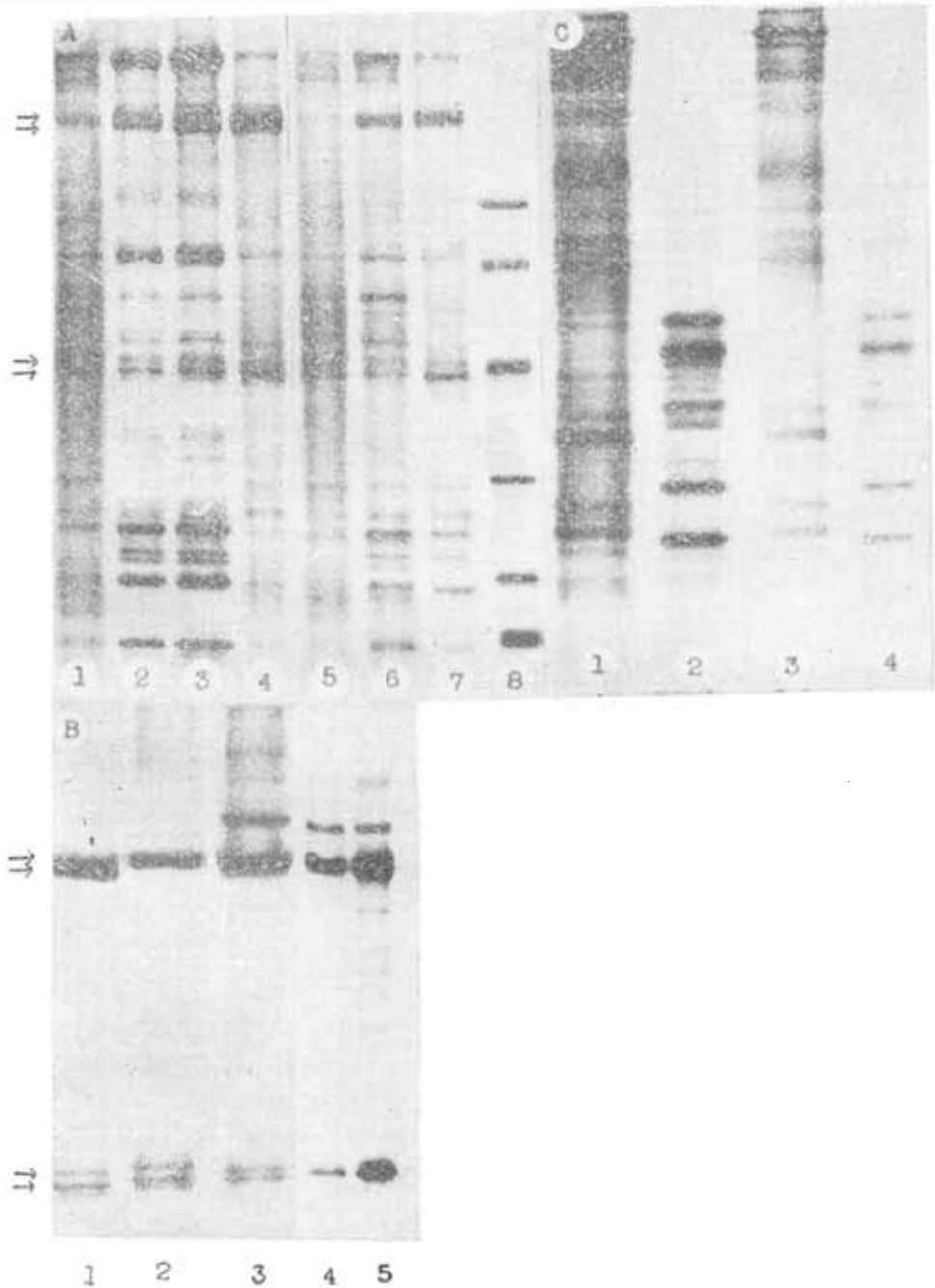
**STUDIES ON THE VITELLOGENESIS OF *COCCINELLA*
SEPTEMPUNCTATA: SYNTHESIS OF VITELLOGENIN BY FAT
BODY *IN VITRO***

ZHAI QI-HUI ZHANG JIAN-ZHONG

(*Institute of Zoology, Academia Sinica*)

In order to further investigate the process of vitellogenesis and the hormonal mechanisms of its regulation in *Coccinella septempunctata*—an important natural enemy of cotton aphid, we have established the *in vitro* fat body culture system, which can faithfully reproduce the synthesis and secretion of vitellogenin (Vg) by the fat body in whole insects. The electrophoretic mobilities, antigenicity, and the proteolytic fragmentation patterns of the Vg obtained *in vitro* were indistinguishable from those of the Vg normally synthesized *in vivo*. The kinetics of incorporation of radioactive amino acid into Vg *in vitro* was similar to that *in vivo*. The synthesis of Vg in the fat body from different stages of ovarian development, and the ZR-512-induced Vg synthesis in the fat body of non-fecund females reared on an artificial diet were examined in the *in vitro* culture system.

Key words *Coccinella septempunctata*—vitellogenesis—vitellogenin synthesis—fat body—juvenile hormone analogue



A. 七星瓢虫雌虫 Vg 的 SDS-电泳图谱

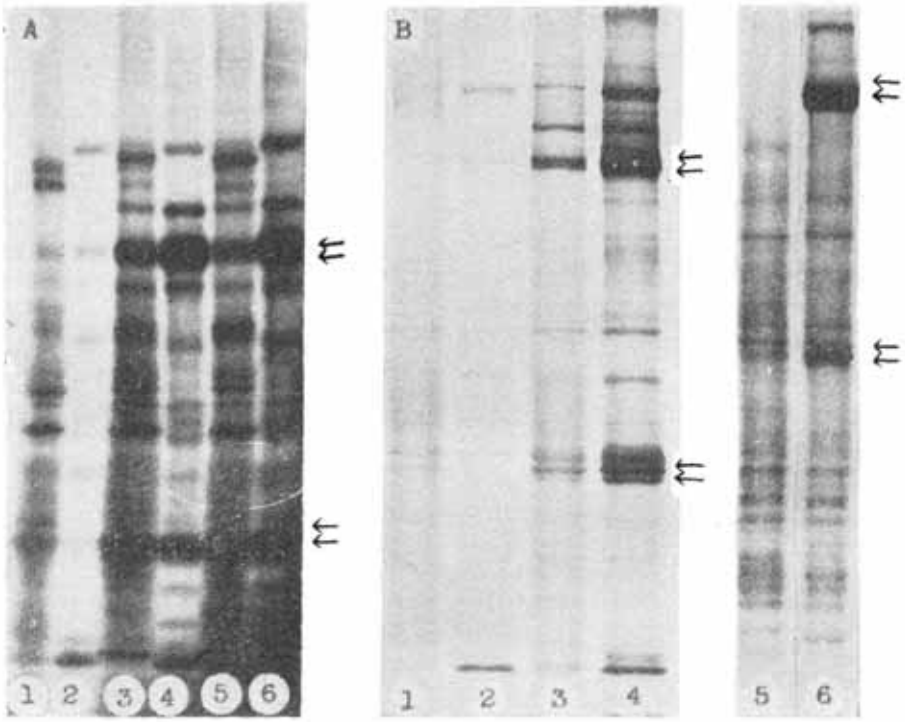
1.脂肪体 2.3.血淋巴 4.卵巢 5.体外培养的脂肪体 6.脂肪体的培养液 7.卵 8.分子量标准蛋白
 从上至下：磷酸化酶 b(94,000)，牛血清清蛋白(67,000)，卵清蛋白(43,000)，碳酸酐酶(30,000)，大豆胰蛋白酶抑制剂(20,100)，溶菌酶(14,400)。箭头表示 Vg 的 4 个亚单位。下同。

B. 抗体沉淀后 Vg 的 SDS-电泳谱的放射自显影图

1.活体标记的卵巢 2.活体标记的血淋巴 3.活体标记的脂肪体 4.体外培养的脂肪体 5.脂肪体的培养液

C. Vg 部分水解肽谱的放射自显影图

1.2.脂肪体体外培养液中的 Vg1, Vg4。 3.4.血淋巴中的 Vg1, Vg4。



A. 不同发育期雌虫的脂肪体及其培养液的 SDS-电泳谱的放射自显影图

- 1.2. 卵黄发生前期雌虫的脂肪体及其培养液,样品的量为 1 个雌虫脂肪体。
- 3.4. 卵黄发生盛期雌虫的脂肪体及其培养液,样品的量为 1/2 个雌虫脂肪体。
- 5.6. 产卵期雌虫的脂肪体及其培养液,样品的量为 1 个雌虫脂肪体。

(根据 2,4,6 扫描后算出不同发育期雌虫的脂肪体 V_g 合成能力的比较见图 3)。

B. 保幼激素类似物 ZR-512 对 V_g 合成的促进作用

- 1—4 SDS-电泳谱的放射自显影图示 ZR-512 处理前后脂肪体的 V_g 合成
 - 1.2. ZR-512 处理前的脂肪体及其培养液
 - 3.4. ZR-512 处理后的脂肪体及其培养液
- 5.6. ZR-512 处理前后卵巢的 SDS-电泳图