

# 褐飞虱可溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳分析\*

梁梓强, 梁士可, 张梅, 王方海

(中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室//昆虫学研究所, 广东 广州 510275)

**摘要:** 采用 SDS-PAGE 电泳分析褐飞虱成虫和各龄期若虫的可溶性蛋白, 结果表明, 成虫各类样品中, 条带数量基本相同, 只发现一条雌性成虫所特有的蛋白条带, 而多数条带在不同翅型或性别样品中存在着含量差异。如有 4 条条带在长翅型中的含量明显高于短翅型中的含量; 在雌、雄成虫样品的比较中则发现 2 条条带在雄虫中含量高于雌虫, 而另有 3 条条带在雌虫中含量高于雄虫。若虫样品随着龄期升高, 条带逐渐增多, 发现有 4 条条带在各个龄期中均有表达, 1 条条带只在 5 龄若虫样品中出现, 另有 1 条条带从 4 龄期开始出现。此外, 还发现有 2 条条带在长翅芽若虫样品中的含量 (9.029, 9.563 ng/ $\mu$ L) 明显高于短翅芽若虫样品中的含量 (5.133, 3.111 ng/ $\mu$ L)。并讨论了这些差异条带与翅型或性别分化方面的关系。

**关键词:** SDS-PAGE; 褐飞虱; 可溶性蛋白; 翅二型性

中图分类号: Q965 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2015) 06-0027-04

## Soluble Proteins in *Nilaparvata lugens* (Stål) by SDS-PAGE

LIANG Ziqiang, LIANG Shike, ZHANG Mei, WANG Fanghai

(State Key Laboratory for Biocontrol and Institute of Entomology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** The soluble proteins in *Nilaparvata lugens* adults and nymphs were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis. Results showed that there were almost equal number protein bands in all types of adult samples, most bands in different wing or gender samples existed content differences except female adult-specific protein band. There were four bands significantly higher in long-winged adult samples than in short-winged adult samples; in the comparison of male and female adult samples, it was found that there were two bands higher in males than in females, while other three bands higher in females than in males. The bands in nymph samples were gradually increased with the increase of age, four bands were constantly expressed in each instar period, one more band appeared in 5<sup>th</sup> instar nymph samples, and one band could be detected from the 4<sup>th</sup> instar. In addition, the contents of two bands were found much higher in long wing bud nymphs (9.029, 9.563 ng/ $\mu$ L) than those in short wing bud nymphs (5.133, 3.111 ng/ $\mu$ L). Last we discussed the relationships among the different bands and wing dimorphism or sex differentiation in insects.

**Key words:** SDS-PAGE; *Nilaparvata lugens* Stål; soluble proteins; wing dimorphism

\* 收稿日期: 2015-01-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (311771844); 广东省自然科学基金资助项目 (2015A030313114)

作者简介: 梁梓强 (1991 年生), 男; 研究方向: 昆虫分子生物学; 通讯作者: 王方海; E-mail: lsswf@mail.sysu.edu.cn

十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS-PAGE) 结合考马斯亮蓝 (Coomassie brilliant blue) 染色法, 可对不同型性的昆虫个体进行蛋白对比分析, 不仅能快速得到各蛋白的相对分子质量, 并可进行半定量分析, 为进一步研究型性差异的具体机制打下基础。

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 体型小, 易迁飞, 繁殖力强, 为稻飞虱的一种。稻飞虱是半翅目中一类小型昆虫, 具有多型现象, 即在同一种内会出现前翅变短、后翅退化的个体, 从而构成长、短两种不同的翅型, 其中短翅型的繁殖能力比长翅型强, 因此长、短翅型的比率可影响褐飞虱的种群动态<sup>[1]</sup>, 同时雌、雄性比也是影响褐飞虱个体数量的关键原因<sup>[2-3]</sup>。因此, 对褐飞虱翅型分化和性别比例作深入研究, 不仅有助于我们对褐飞虱的发生作出更准确的预报, 而且也有益于我们探索新的控制飞虱危害的方法。

保幼激素是影响翅型分化的关键因子<sup>[4-5]</sup>, 可被保幼激素酯酶降解<sup>[6]</sup>, 而卵黄蛋白含量是评价雌性个体繁殖力的主要指标之一<sup>[7]</sup>。故近几年主要围绕这些激素和蛋白对褐飞虱的繁殖和翅型分化的机理展开了大量的研究, 但有关其它蛋白在翅型或性别分化中的作用则少有研究。鉴于褐飞虱虫体可溶性蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析尚未有报道, 故本文对不同发育期的褐飞虱个体进行了蛋白电泳分析, 重点比较了不同翅型和不同性别个体间的蛋白图谱差异, 找出与翅型或性别相关联的特异蛋白, 以期进一步解析飞虱翅型分化或性别分化机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试昆虫

褐飞虱成虫采自广州市华南农业大学水稻试验田内, 室内进行繁殖, 采用水稻品种籼小占经催芽播种后长成的稻苗为饲料, 饲养条件控制在 28 °C、RH 85% 左右、灯光照明时间为 16 h 光照: 8 h 黑暗。

### 1.2 血淋巴蛋白质的提取

选取褐飞虱长翅型雄成虫、长翅型雌成虫、短翅型雄成虫和短翅型雌成虫各 5 头, 洗净晾干, 分别加入适量混有 Protease Inhibitor Cocktail Set I (Merck 公司) 的昆虫生理盐水后, 随机将虫体剪成数块, 冰浴浸取 30 min, 期间震荡摇匀 2~3 次, 4 °C 离心后小心吸取上清。再次加入适量生理盐水, 重复操作一次。两次上清混合液即为血淋巴蛋白质样品。并将沉淀物洗净晾干, 冰中保存, 留待

提取组织中可溶性蛋白用。

### 1.3 组织中可溶性蛋白质的提取

准备一龄、二龄、三龄、四龄、五龄长翅芽和五龄短翅芽若虫各 10 头左右, 连同上述成虫样品离心后所保留的沉淀, 分别加入适量混有 Protease Inhibitor Cocktail Set I (Merck 公司) 的 RIPA 裂解液后, 用玻璃匀浆器冰浴匀浆 30 min, 4 °C 离心, 所得上清即为组织中可溶性蛋白质样品。

### 1.4 SDS-PAGE 蛋白电泳

蛋白质样品按  $V(2 \times \text{蛋白质上样缓冲液}) : V(\text{蛋白质样品}) = 1:1$  混匀, 在沸水浴中煮沸 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 小心取上清液 20  $\mu\text{L}$  上样。先恒流 15 mA 10 min, 再升高到 30 mA 进行电泳。电泳完毕后, 进行染色、脱色、拍照等, 并利用 BandScan 软件进行扫描与半定量分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 褐飞虱成虫 SDS-PAGE 可溶性蛋白电泳分析

褐飞虱成虫可溶性蛋白电泳结果如图 1。其中图 1A 图为雄成虫样品电泳图, 共可观察到 30 条比较清晰的条带; 图 1B 图为雌成虫样品电泳图, 则可观察到 31 条条带, 其中条带 5 为雌成虫所特有, 而其他条带与雄成虫的 30 条条带一一对应。该结果表明, 褐飞虱与翅型或性别相关联的特有的可溶性蛋白极少, 多数蛋白条带在长、短翅型个体中或雌、雄个体中表现出的是含量上的差异, 如条带 6 在长翅型雄虫组织中的含量明显高于在短翅型雄虫组织的含量, 而条带 2 在长翅型雌虫血淋巴中的含量则明显高于长翅型雄虫血淋巴的含量。

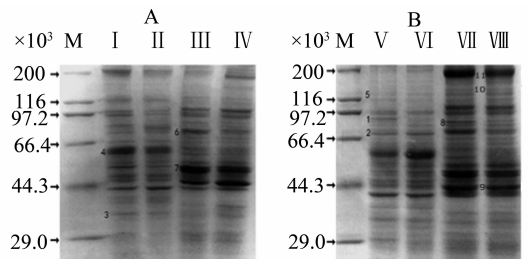


图 1 褐飞虱成虫可溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 1 The soluble protein of *N. lugens* adults on SDS-PAGE gel

M: 蛋白质 marker; I: 长翅型雄虫血淋巴; II: 短翅型雄虫血淋巴; III: 长翅型雄虫组织提取的可溶性蛋白; IV: 短翅型雄虫组织提取的可溶性蛋白; V: 长翅型雌虫血淋巴; VI: 短翅型雌虫血淋巴; VII: 长翅型雌虫组织提取的可溶性蛋白; VIII: 短翅型雌虫组织提取的可溶性蛋白。差异明显的条带用阿拉伯数字 (1-11) 标出。

利用 BandScan 软件对图中标出的 1-11 的蛋白条带（在不同翅型间或不同性别间含量差异较大）进行半定量分析，结果见表 1。

条带 1、6、7、8 的含量，长翅型比短翅型高，应与褐飞虱的翅型分化存在一定关联。已有研究表明，长翅型褐飞虱成虫中保幼激素酯酶含量高，通过 Uniprot 数据库检索到其相对分子质量为 66 725，与条带 2 的相对分子质量接近，故推测条带 2 可能为保幼激素酯酶，但其含量在两种翅型的成虫中差异并不明显，尚有待进一步验证。条带 1、2、3、7、8 含量在雌、雄个体间存在明显差异，其中条带 2、3、8 在雌虫体内含量较高，而条带 1、7 在雄虫体内含量较高。有趣的是条带 1、7、8 在长、短翅型间或雌、雄个体间含量均存在明显差异，推测此类蛋白可能同时参与了翅型分化和性别分化的调控。条带 4 在长翅雄虫中含量高于短翅雄虫，然而长翅雌虫中含量却低于短翅雌虫，故此种蛋白对翅型分化的调控作用可能还与具体的性别有一定联系。卵黄蛋白由 3 个亚基组成，相对分子质量分别为 44 000、124 500、148 000<sup>[7]</sup>，与我们的条带 9、10、11 相对应。从表 1 中发现，条带 9 在长、短雌雄成虫中均有表达，且在含量上比较接近；条带 10 在短翅型雄成虫和长、短雌成虫中有表达，但在长翅型雄成虫未见明显条带，可能没有表达或表达量极低；条带 11 与条带 10 类似，只在短翅型雄成虫和长、短雌成虫中有表达，但在雌成虫中的表达量明显高于条带 9 或 10。

### 2.2 褐飞虱若虫 SDS-PAGE 可溶性蛋白电泳分析

图 2 是褐飞虱若虫样品电泳结果图，1 龄若虫样品只能辨别出 3 条条带，随着龄期升高，条带逐

渐增多，如 3 龄若虫样品有 9 个条带，到 5 龄时则条带数超过 20 条，与成虫的条带数接近。说明褐飞虱生长发育过程中，随着结构和功能的复杂化，参与作用的蛋白种类愈来愈多。

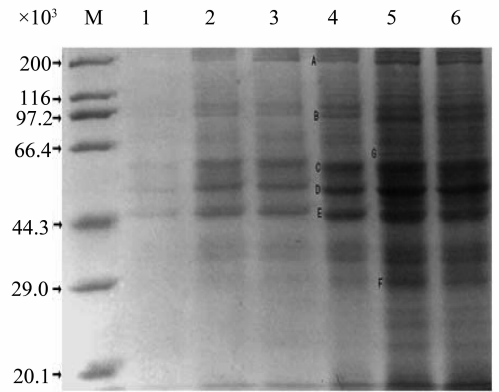


图 2 褐飞虱各龄期若虫可溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳图  
Fig. 2 Analysis of the soluble proteins of *N. lugens* larvae by SDS-PAGE

M: 蛋白质 marker; 1、2、3、4、5、6 泳道分别为 1 龄若虫、2 龄若虫、3 龄若虫、4 龄若虫、5 龄长翅芽若虫、5 龄短翅芽若虫样品；以字母 A-G 分别标出比较明显的条带

利用 BandScan 软件对图中标出的 A-G 蛋白条带进行半定量分析，结果见表 2。在各龄期样品中均以条带 E 含量最高，预示该条带有可能是储存类蛋白；条带 A、B、C、D、E 在各个龄期中均有表达，说明褐飞虱在不同龄期的发育过程中均需要这些蛋白的参与，其中条带 A 和 E 的相对分子质量与褐飞虱卵黄蛋白的 2 个亚基相对分子质量非常接近<sup>[7]</sup>，因此这 2 个条带有可能是卵黄蛋白亚基。同时，我们发现个别龄期具有特定的蛋白条带，如

表 1 褐飞虱成虫可溶性蛋白差异条带及其含量分析<sup>1)</sup>

Table 1 The content analysis of differential bands of soluble proteins in *N. lugens* adults ng · μL<sup>-1</sup>

可溶性蛋白来源	条带编号	相对分子质量/10 <sup>3</sup>	雄成虫		雌成虫	
			长翅	短翅	长翅	短翅
血淋巴	1	90	10.635	3.742	9.007	-
	2	70	5.077	4.845	15.253	15.061
	3	35	8.668	5.513	15.981	14.279
	4	62	68.158	44.470	55.858	95.889
	5	120	-	-	2.121	5.162
组织	6	75	26.789	12.629	31.540	20.078
	7	51	44.615	37.155	38.255	16.360
	8	81	5.604	2.392	13.440	4.175
	9	44	31.999	30.247	30.700	31.882
	10	124.5	-	6.076	6.028	5.919
	11	148	-	27.011	108.230	73.940

1) “-”：不存在该条带

F 条带只在 5 龄若虫样品中出现, 而 1-3 龄若虫样品中未出现 G 条带, 直到 4 龄时样品中才能检测到。此外, 我们还比较了 5 龄长翅芽若虫和短翅芽若虫的可溶性蛋白差异, 发现条带 B 在长翅芽若虫样品中的含量 (9.029 ng/ $\mu$ L) 明显高于短翅

芽若虫样品中的含量 (5.133 ng/ $\mu$ L), 而长翅芽若虫样品中的条带 G 的含量则是短翅芽若虫样品中含量的 3 倍左右, 说明这 2 个条带可能与翅型分化有关。

表 2 褐飞虱若虫可溶性蛋白差异条带及其含量分析<sup>1)</sup>

Table 2 The content analysis of differential bands of soluble proteins in *N. lugens* larvae

ng· $\mu$ L<sup>-1</sup>

条带编号	相对分子质量/ $10^3$	1 龄	2 龄	3 龄	4 龄	5 龄长翅芽	5 龄短翅芽
A	148	0.735	3.164	2.826	9.739	12.171	14.604
B	97	1.376	3.137	2.935	4.754	9.029	5.133
C	62	1.149	20.786	24.710	28.924	33.147	32.093
D	51	3.396	12.876	14.320	27.831	26.527	28.146
E	44	5.469	22.214	27.321	48.695	40.281	34.714
F	64	—	—	—	—	3.118	2.416
G	29	—	—	—	3.285	9.563	3.111

1) “—”: 表示该条带不存在

### 3 讨论

SDS-PAGE 电泳法有操作简单, 时间短等优点, 但是存在着自身分辨率低等缺陷。所以, 本研究虽然得到与性别和翅型两性状相关联的差异条带, 仍很难确定这些差异条带是否是单一蛋白。接下来的工作要通过双向电泳等方法提高分辨率, 找到单一的差异条带, 利于进一步的分析。

对比不同翅型和性别样品的电泳谱图, 我们获得了与褐飞虱性别和翅型都存在着关联的 3 条差异条带, 据此推测, 褐飞虱中, 性别和翅型的分化可能受到一些相同蛋白质的调控, 也预示这两种型性间可能存在某些内部联系。在水稻害虫预测预报中, 如能综合考虑长、短翅型比率和雌、雄性比这两个方面的参数, 应可以提高褐飞虱种群数量预测的及时性和准确性。

通过对褐飞虱各龄若虫组织蛋白的分析, 初步探讨了若虫发育过程中体内蛋白的变化规律以及一些龄期的特有蛋白, 研究结果有可能对今后进一步深入研究若虫发育调控蛋白提供帮助。

接下来的工作我们拟通过双向电泳和质谱等分析手段对褐飞虱可溶性蛋白进行深入研究, 从而确

定与翅型或性别相关联蛋白的具体性质, 以进一步解析昆虫多型形象的分子机制。

#### 参考文献:

- [1] 周崇高, 冯娅琳, 陆潮峰, 等. 稻飞虱翅型分化的研究进展[J]. 湖北农业科学, 20014, 53 (17): 3985 - 3990.
- [2] 施辰于, 王海荣, 戈林泉, 等. 低温对褐飞虱发育、生殖的影响[J]. 上海交通大学学报, 2010, 28: 292 - 295.
- [3] 李少珍, 李少山, 王建国, 等. 晚稻田褐飞虱和白背飞虱种群结构时序动态研究[J]. 江西农业大学学报, 2014, 36 (5): 1036 - 1041.
- [4] IWANAGA K, TOJO S. Effects of juvenile hormone and rearing density on wing dimorphism and oocyte development in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* [J]. Journal of Insect Physiology, 1986, 32(6): 585 - 590.
- [5] 张琼秀, 孙梓暄, 李广宏, 等. 外源激素对褐飞虱翅型分化的影响[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2007, 46(3): 76 - 78.
- [6] 解再宏, 苏品, 廖晓兰. 褐飞虱翅型分化影响因素及机制研究综述[J]. 江西农业学报, 2009, 21(10): 95 - 99.
- [7] 衣维贤. 褐飞虱卵黄蛋白的性质及高温对卵黄发生的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2003.