

86.5-a.

昆虫学研究集刊

第一集

1980



中国科学院上海昆虫研究所编
上海科学技术出版社

昆虫学研究集刊

第一集

1980

中国科学院上海昆虫研究所编
上海科学技术出版社

昆虫学研究集刊

第一集

1980

中国科学院上海昆虫研究所编

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路450号)

新华书店上海发行所发行 上海市印刷三厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张14.25 插页4 字彙318,000

1982年4月第1版 1982年4月第1次印刷

印数: 1—6,100

统一书号: 13119.967 定价: (科五) 1.95元

20-羟基蜕皮酮的放射免疫 分析法及其在蓖麻蚕蛹上的应用*

曹梅讯 朱湘雄 陈志辅

夏克敏

(中国科学院上海昆虫研究所) (中国科学院上海有机化学研究所)

昆虫的周期性蜕皮现象系由蜕皮激素所控制,这种激素以极微的量存在于血淋巴中。正确地测定它在体内的变化,是研究它的作用机理的一个重要环节。昆虫蜕皮激素的丽蝇分析曾对激素的研究起了推动作用,但其灵敏度仅为50—150毫微克。直至近十年来,由于气相层析的广泛应用和放射免疫分析法(以下简称RIA)的迅速发展,才为蜕皮激素的测定开辟了新的途径。

蜕皮激素 RIA 的基本原理是基于蜕皮激素、放射性同位素标记蜕皮激素竞争与蜕皮激素的抗体结合。由于蜕皮激素的分子较小,不能直接引起被注射动物的免疫反应。必须与载体蛋白大分子共价结合后,注射动物,才能产生抗蜕皮激素的特异抗体。利用抗原-抗体之间特异反应所建立起来的 RIA 是一种超微量分析方法,它具有高特异性和灵敏度,取样量少,操作简便快速等特点。

昆虫前胸腺分泌的蜕皮酮必须转化为 20-羟基蜕皮酮才有生物活性。这两种激素的结构十分相似,已报道的 20-羟基蜕皮酮 RIA (Chang and O'Connor, 1979), 由于抗血清特异性不高,也能与蜕皮酮结合,交叉反应多在30%以上。本文建立的一种高特异性的 20-羟基蜕皮酮 RIA, 可以克服上述缺点。

材 料 和 方 法

一、抗原的制备

抗原的制备,分两步合成 (Borst and O'Connor, 1974)。

1. 20-羟基蜕皮酮-6-(0-羧甲基)肟的制备 300 毫克 20-羟基蜕皮酮加 7.5 毫升吡啶溶解后,再加 400 毫克 0-羧甲基羟胺盐酸盐,在 28°C 恒温放置过夜。在 40°C 以下经薄膜蒸馏除去溶剂后加水,再以正丁醇抽提三次,水洗三次。然后在 40°C 以下减压回收正丁醇,抽干得粗产物。最后经用氯仿:甲醇 (3:2) 为展开剂,制备性荧光薄层层析(硅胶 F₂₅₄)分离,得 150 毫克 20-羟基蜕皮酮-6-(0-羧甲基)肟。

上述产物用氯仿:甲醇 (3:2) 为展开剂,以荧光薄层层析(硅胶 F₂₅₄)鉴定,在紫外灯下显示一个斑点。硫酸-香兰素显色时显黄色,其比移值为 0.26。20-羟基蜕皮酮显

* 蒋容静、刘正廉两位同志参加部分工作。

示橄榄青, 比移值为 0.8。

20-羟基蜕皮酮的紫外光谱为 $\lambda_{\max}^{25^\circ\text{C}}$ 252nm (ϵ 12,300), 20-羟基蜕皮酮-6-(0-羧甲基)肼为 $\lambda_{\max}^{25^\circ\text{C}}$ 242nm (ϵ 12,400)。

2. 20-羟基蜕皮酮-6-(0-羧甲基)肼-牛血清白蛋白(MH-BSA)的制备 8.4 毫克 20-羟基蜕皮酮-6-(0-羧甲基)肼, 0.3 毫升二氧六环和 0.01 毫升三正丁胺混合溶解, 并冷却到 4°C。加入 0.004 毫升氯甲酸异丁酯, 在 4°C 搅拌 30 分钟, 为混合物①。

18 毫克牛血清白蛋白溶于 0.6 毫升水里, 并依次加入 0.4 毫升二氧六环和 1N NaOH, 使 pH 为 8.5, 冷却到 4°C, 为混合物②。

把①迅速地加到②里, 在 4°C 搅拌 1 小时后, 再用 1N NaOH 调节至 pH8.5, 继续搅拌 4 小时。产品对水透析过夜, 然后冰冻干燥。

根据紫外分光光度法测定结果进行计算, 每克分子牛血清白蛋白结合 19 克分子 20-羟基蜕皮酮-6-(0-羧甲基)肼。

二、抗血清

用 MH-BSA 人工抗原免疫体重 2 公斤的成年雄性家兔。第一次每只家兔用 1 毫升 0.9% 氯化钠注射用水和 1 毫升福氏完全辅基配制的 2 毫克抗原, 皮内注射于背颈部多处。以后每个月以同样剂量加强注射一次。注射后 10—14 天从耳静脉抽血。取血清, 测定滴度。合用的抗血清加 0.1% NaN_3 后分装, 保存于 -20°C。3 只兔子中有一只在 3 个月, 其抗血清滴度达 1:10,000。

三、碘-125 标记抗原的制备

1. 20-羟基蜕皮酮-2-半琥珀酸的制备 100 毫克 20-羟基蜕皮酮溶于 30 毫升二氧六环中, 加入 1.5 克琥珀酸酐和 7.5 毫升三乙胺, 在室温 19°C 放置过夜。然后加水以正丁醇提取, 少量水洗, 再减压回收正丁醇, 抽干得粗产物。该物经用氯仿: 甲醇(3:2)为展开剂, 制备性薄层层析(硅胶 F_{254})纯化分离后得 20-羟基蜕皮酮-2-半琥珀酸, 在紫外灯下显示一个斑点, 其比移值为 0.5。与文献报道的相仿(De Reggi 等, 1975)。

2. 20-羟基蜕皮酮-2-半琥珀酸-酪氨酸甲酯(SETME)的制备 50 毫克 20-羟基蜕皮酮-2-半琥珀酸加 1.7 毫升二氧六环和 0.03 毫升三正丁胺, 在 10°C 时加入 0.015 毫升氯甲酸异丁酯, 搅拌 40 分钟。另取 25 毫克酪氨酸甲酯(TME)溶于 8 毫升水的混合液, 于 10°C 时加入上述搅拌液中, 继续搅拌 2 小时, 室温放置过夜。然后将反应液倒入水中, 以正丁醇提取三次, 少量水洗后减压回收正丁醇, 抽干得粗产物。经用氯仿: 甲醇(3:1)为展开剂, 制备性薄层层析(硅胶 F_{254})分离得 20 毫克 20-羟基蜕皮酮-2-半琥珀酸-酪氨酸甲酯。该化合物以氯仿: 甲醇(3:1)为展开剂, 薄层层析(硅胶 F_{254})鉴定, 在紫外灯下显示为一个斑点, 其比移值是 0.6。20-羟基蜕皮酮-2-半琥珀酸的比移值是 0.2, 20-羟基蜕皮酮的比移值是 0.48。

SETME 的紫外光谱为 $\lambda_{\max}^{25^\circ\text{C}}$ 242 和 278nm。SETME 经用 Ehrlich 重氮法测定, 呈显橙色(酚基)。

3. SETME 的 ^{125}I 标记 参考 Midgley 等(1971)所用的方法, 依次在反应管中加入 10 微升 0.5M pH7.5 的磷酸盐缓冲液(PBS), 10 微克 SETME, Na^{125}I 2 毫居里(中国科学院原子能研究所产品, 每毫升 40 毫居里), 用 0.05M pH7.5 的 PBS 新鲜配制的

氯胺 T 溶液(每毫升 10 毫克) 20 微升, 混匀。反应 2 分钟后, 加入新鲜配制的偏焦亚硫酸钠溶液(每毫升 20 毫克) 20 微升, 摇匀。

产物用制备性薄层层析(硅胶 F₂₅₄) 进行分离, 展开剂为甲醇: 氯仿: 水 (60: 30: 5)。用 GP—I 型单道 γ 能谱仪狭缝扫描确定位置, 刮下硅胶, 用 70% 甲醇抽提, 保存于 -20°C。

四、放射免疫测定

1. 试剂

(1) 含 0.1% NaN₃ 的 0.1% 明胶-0.1M 磷酸盐缓冲液生理盐水 (pH 7.0) (以下简称 GPBS), 保存于 4°C。

(2) 葡聚糖包活性炭悬浮液(以下简称 DCC): 其中葡聚糖 T-70 的浓度为 0.25%, Norit A 活性炭的浓度为 2.5%, 用 GPBS 配制, 保存于 4°C。

(3) 标准 20-羟基蜕皮酮: 层析纯, 中国科学院上海有机化学研究所提供。用无水乙醇配成每毫升 1 微克, 作为母液, 保存于 -20°C。每次实验时, 准确吸取 80 微升, 蒸干溶剂, 加 10 毫升 GPBS 再溶解, 然后依次倍比稀释, 得每毫升含 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 和 0.125 毫微克的标准品系列。

2. 标准曲线的制作 取 12×75 毫米玻璃试管 16 只, 依次加入不同浓度的标准 20-羟基蜕皮酮溶液 200 微升(分别含 0, 25, 100, 200, 400, 800, 1,600 微微克)。每管再加 1:10,000 稀释度的抗血清 100 微升, 然后再各加 ¹²⁵I-SETME 100 微升(每分钟 10,000 计数, 即 10,000 cpm)。另取两管不加抗血清, 而用 100 微升 GPBS 代替, 用作测量非特异性结合率。混匀后, 在 4°C 过夜。次日, 用 FJ-603* 型 γ 闪烁计数器先测定各管的总放射性。然后加 DCC 0.5 毫升, 回旋振荡 1 分钟后, 4°C 中静置 10 分钟, 离心 5 分钟(每分钟 3,000 转), 抽吸掉上清液后, 再测定沉淀物的放射性。

3. 样品测量 取蓖麻蚕蛹血淋巴于玻璃试管中, 用甲醇抽提 2—3 次, 蒸干甲醇抽提液后, 加 GPBS 200 微升溶解蒸干物。然后加抗血清 100 微升和 ¹²⁵I-SETME 100 微升(10,000 cpm)。以下步骤与标准管的相同。

五、计算

各管的 cpm 减去本底 cpm 后得净 cpm。各管离心前的净 cpm 减去离心后的净 cpm, 被离心前的净 cpm 除, 再乘以 100, 即得各自的结合率。各管的结合率还要扣除非特异性结合率。然后用标准 20-羟基蜕皮酮为零的结合率除以各管的结合率, 再乘以 100 得各管的竞争抑制率。

以已知标准 20-羟基蜕皮酮的量为横坐标, 对应的竞争抑制率为纵坐标, 作图, 即得标准曲线。样品量可根据其竞争抑制率从标准曲线上读出。

结 果

一、方法的可靠性

1. 灵敏度 方法的灵敏度取决于标准曲线的范围及所能测得的最小量。

本法建立的标准曲线范围是 0—1,600 微微克。根据 7 条标准曲线计算, 最小可测量

为 20 微微克。这 7 条标准曲线各点的重复性尚可, 平均变异系数为 6.9% (见图 1)。

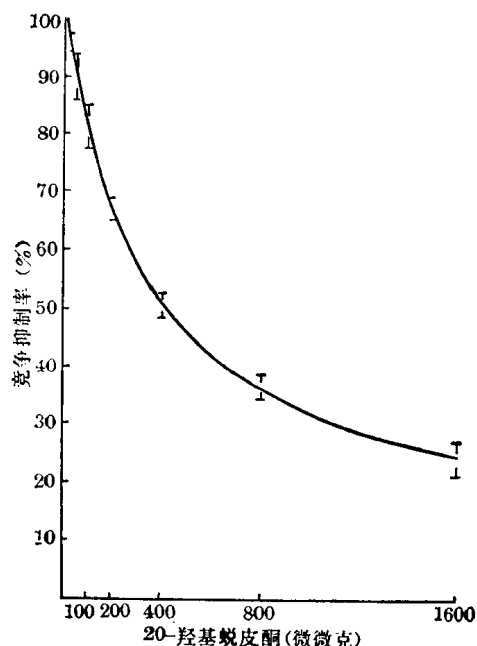


图 1 标准竞争结合曲线
(每点代表 7 次测定的平均值 $\pm$ SD)

2. 抗血清的特异性 抗原-抗体反应的专一性取决于抗体的特异性。提高抗体的特异性, 可以提高方法的正确性和精密度。通常鉴定抗体特异性的方法是测定抗体对其他抗原交叉反应的程度, 交叉反应越小, 特异性越高。本抗血清与蜕皮酮、平卧川牛膝甾酮 (Cyasterone)、百日清甾酮 (Ponasterone A)、水龙骨科素 (Polypodine B) 及胆固醇的交叉反应率分别为 7.4%, 0.4%, 1%, 84% 及 $<0.1\%$ (见表 1)。

3. 方法的正确性和精确度 用回收试验鉴定方法的正确性。在 GPBS 中添加不同量标准 20-羟基蜕皮酮的回收结果见表 2。表中也列出了标准误差及变异系数以表示精确度。

二、蓖麻蚕蛹期血淋巴中-20羟基蜕皮酮含量的变化

表 1 一些甾体化合物与抗 20-羟基蜕皮酮血清的结合能力

被测试化合物	抑制 ^{125}I -SETME 结合 50% 时所需毫克数
20-羟基蜕皮酮	0.21
水龙骨科素	0.24
蜕皮酮	2.84
百日青甾酮	15
平卧川牛膝甾酮	50
胆固醇	a*

* a. 浓度至 500 毫克仍未达到 50% 抑制。

表 2 已知 20-羟基蜕皮酮量在 GPBS 中的回收

加入量 (微微克)	样品数	实测量(微微克) $m \pm \text{SD}$	变异系数 (%)	回收率 (%)
600	10	624 ± 63	10	104
2,400	10	$2,351 \pm 357$	15	98

化蛹后每天在同一只蛹上取血淋巴 20 微升, 直至羽化。雌雄各 3 只。蚕蛹保存于 23°C , 19 天羽化。血淋巴用甲醇抽提 3 次, 合并甲醇抽提液, 蒸干溶剂后, 用 GPBS 重

新溶解。取一定的量供放射免疫测定。

结果见图 2。

讨 论

大多数甾体激素的 RIA 使用 ^3H 标记抗原。由于液体闪烁法测定 ^3H 既麻烦又费钱, 特别是当 ^3H 标记抗原的比放射性低时会影响 RIA 的灵敏度。 ^{125}I 标记抗原不仅比放射性高, 提高了测定的灵敏度, 而且可用普通的 γ 闪烁仪测量, 节省大量液体闪烁剂, 避免了由于样品中杂质对液闪测量的干扰。因此在测量方面具有简便、快速、经济等优点, 从而获得了迅速的发展。

在应用 ^{125}I 标记抗原中也有一些不足之处。最主要的就是 ^{125}I 标记抗原与用相同衍生物制备的免疫原诱发的抗血清的亲和力, 大于未标记的半抗原。所以加了半抗原后不能竞争抑制标记抗原与抗血清的结合, 不服从质量作用定律而影响 RIA (Allen and Redshaw, 1978)。改进的方法是免疫原与标记抗原或使用不同的半抗原衍生物(异桥结合系统 heterologous bridge system)或联接的位置不同(异位结合系统 heterologous site system)。我们所用免疫原是在 6 位接牛血清白蛋白, 标记用抗原是在 2 位接酪氨酸甲酯, 基本上属于异位结合系统。这样做不仅避免了上述缺点, 而且也可能有助于提高抗血清的特异性。Borst and O'Connor 及 Porcheron 等都使用 6 位接牛血清白蛋白的免疫原, 但所得抗血清与蜕皮酮的交叉反应大 (20~100%), 而我们所得的抗血清与蜕皮酮的交叉反应率仅 7% 左右。所以在一般情况下, 样品只要经过简单的有机溶剂抽提, 不需薄层层析进一步纯化, 就可直接作放射免疫测定。

由于本法灵敏度高, 所以有可能在一个昆虫上连续取样, 追溯 20-羟基蜕皮酮的变化。本实验中所测的蓖麻蚕蛹, 无论是雌或雄, 都是刚化蛹时 20-羟基蜕皮酮在血淋巴中的含量低, 然后随着发育而逐渐升高, 第 9 天左右达高峰, 接着逐渐下降, 直至羽化。其趋势与 Calvez 等 (1976) 在家蚕上所得的结果相似。由于我们的实验材料保存在 23°C , 羽化期推迟, 因此激素高峰也相应推迟出现。此外, 蓖麻蚕与柞蚕的亲缘关系比家蚕的近, 所以激素量也接近于柞蚕的。

经过反复使用和在家蚕、蚊 (朱湘雄等, 1980) 等昆虫不同发育阶段上的应用, 表明本法稳定、可靠, 与已发表的同类方法 (Chang and O'Connor, 1979) 相比较, 具有灵敏度和特异性高, 特别是能有效地区别 20-羟基蜕皮酮和蜕皮酮的特点, 完全可应用于昆虫激素的研究中。

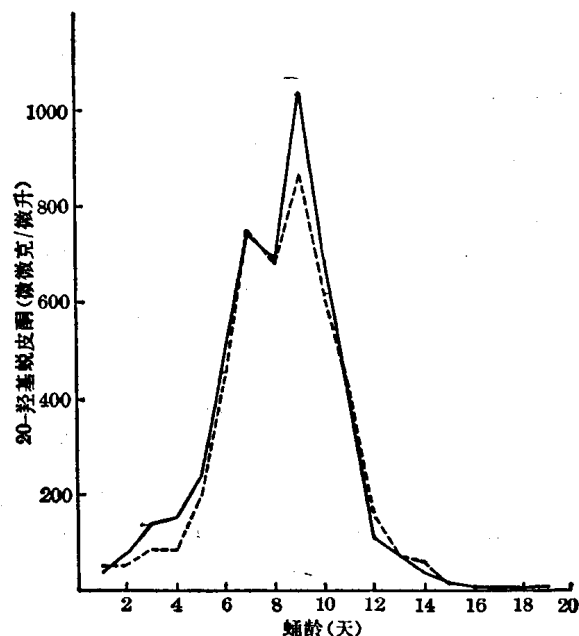


图 2 蓖麻蚕蛹血淋巴中 20-羟基蜕皮酮量在蛹期的变化
(·——· 雄蛹, ·----· 雌蛹)

参 考 文 献

- [1] 朱湘雄、陈志辅、曹梅讯。1980。淡色库蚊成虫期内源蜕皮激素水平及雌蚊卵黄原蛋白的合成。昆虫学研究集刊, 第一集, 63—68, 上海科学技术出版社。
- [2] Allen, R. M. and Redshaw, M. R. 1978 The use of homologous and heterologous ^{125}I -radioligands in the radioimmunoassay of progesterone. *Steroids* 32: 467—486.
- [3] Borst, D. W. and O'Connor, J. D. 1974 Trace analysis of ecdysones by gasliquid chromatography, radioimmunoassay and bioassay. *Steroids* 24: 637—656.
- [4] Calvez, B., Hirn, M. and De Reggi, M. 1976 Ecdysone changes in the haemolymph of two silkworms (*Bombyx mori* and *Philosamia cynthia*) during larval and pupal development. *FEBS Lett.* 71: 57—61.
- [5] Chang, E. S., and O'Connor, J. D. 1979 Arthropod molting hormones In 'Methods of Hormone Radioimmunoassay' second edition, pp. 797—814, Academic Press Inc.
- [6] De Reggi, M. L., Hirn M. H. and Delaage, M. A. 1975 Radioimmunoassay of ecdysone. An application to *Drosophila* larvae and pupae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66: 1307—1315.
- [7] Midgley, A. R., Jr., Niswender, G. D., Gay, V. L. and Reichert, L. E., Jr., 1971 Use of antibodies for characterization of gonadotropins and steroids. *Recent Prog. Horm. Res.* 27: 235—286.

**RADIOIMMUNOASSAY OF 20-HYDROXYECDYSONE. AN
APPLICATION TO THE PUPAE OF ERISILKWORM,
PHILOSAMIA CYNTHIA RICINI DONOVAN**

Cao Mei-xun Zhu Xiang-xiong Chen Zhi-fu

(Shanghai Institute of Entomology, Academia Sinica)

Xia Ke-min

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica)

An efficient radioimmunoassay for quantifying the physiological level of 20-hydroxyecdysone has been developed, using ^{125}I -succinyl 20-hydroxyecdysone tyrosine methyl ester (^{125}I -SETME) as radioligand and 20-hydroxyecdysone carboxymethyloxime BSA conjugate as immunogen. The antisera we have got are highly specific for 20-hydroxyecdysone and capable of distinguishing it from closely related compounds; 50% displacement of ^{125}I -SETME by ecdysone occurred at about a 12-fold higher concentration than required for displacement by cold 20-hydroxyecdysone.

It was applied to determination of 20-hydroxyecdysone level in *Philosamia cynthia ricini* Donovan during pupal stage. At 23 °C, a peak of 20-hydroxyecdysone occurred on 9th day after pupation.

蓖麻蚕后丝腺和脂肪体信使核糖核酸 的分离和活性测定*

邹柏祥 林浩

林炳辉

(中国科学院上海昆虫研究所)

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

许廷森

(中国科学院上海生物化学研究所)

蚕后丝腺是合成丝心蛋白的重要部位。信使核糖核酸与若干核糖体相连形成多聚核糖体是合成丝心蛋白的功能单位。昆虫脂肪体是合成和分解代谢最旺盛的器官,也是昆虫激素作用的重要靶组织,从而对代谢进行调节控制(Price等,1973)。保幼激素类似物对家蚕和蓖麻蚕后丝腺、脂肪体合成甘氨酸、丙氨酸有关酶系以及精氨酸酶有明显的调节控制(林浩等,1980;许廷森等,1980)。为了研究昆虫激素对蚕丝蛋白和酶蛋白生物合成的基因表达和调节控制,首先必须抽提、分离信使核糖核酸(mRNA)。本文用寡聚胸腺嘧啶脱氧核苷酸纤维素[oligo(dT)-cellulose]和琼脂糖2B(Sepharese 2B)分离蓖麻蚕后丝腺和脂肪体 mRNA,并测定了后丝腺 mRNA 的生物活性。

材 料 和 方 法

一、蓖麻蚕

五龄五天的印白黄。由广东石牌蚕种场和中国农科院蚕业研究所供给。

二、层析试剂

oligo(dT)-纤维素为上海试剂二厂产品。吸附 PolyA 的能力为 1000 微克/克干重 oligo(dT)。Sepharese 2B 为 Pharmacia 产品。其他化学试剂均为分析纯。

三、蓖麻蚕后丝腺和脂肪体总 RNA 的提取以及 mRNA 的分离和鉴定

1. 总 RNA 的制备 解剖五龄五天蓖麻蚕,取后丝腺和脂肪体用冰冷的 SSC 溶液(含 0.15M NaCl-0.015M 柠檬酸钠溶液)洗涤,并用滤纸吸干,立即放入干冰保存。制备方法参照 Greene 等(1975)方法并稍加改进。称取一定量后丝腺或脂肪体,用 10 倍体积冷的 TEN 溶液[50mM Tris-HCl pH7.6, 5mM EDTA, 0.1M NaCl, 0.5%SDS, 0.001%

* 本文 mRNA 的活性测定得到中国科学院上海细胞生物学研究所朱心良、陈乐容、张尚权等同志的协助。特此致谢。

聚乙烯醇 (PVS)]，在 MSE 高速匀浆器中匀浆 2 分钟。所得匀浆与等体积的上述缓冲液饱和的含 0.2% 8-羟基喹啉的重蒸酚混合，室温剧烈振动 20 分钟，于 4°C 以 5000 转/分 (MSE-18 高速离心机) 离心 15 分钟。分出水相，酚相中加入半倍体积的 TEN 缓冲液，室温摇匀 10 分钟，以 5000 转/分离心 15 分钟。合并两次水相，加等体积的饱和酚溶液抽提 2 次，使水酚两相间的蛋白沉淀层很少或消失。收集水相，加入 NaCl 使最后浓度为 0.3M，加 2 倍体积冷的 95% 乙醇，即有白色絮状沉淀出现。放低温冰箱过夜，使其沉淀完全。此步反复沉淀两次。离心收集的沉淀为总 RNA，冷冻干燥放低温冰箱保存。

2. mRNA 的分离

(1) mRNA 在 oligo(dT)-纤维素层析上的分离方法 用升温 and 降低离子强度层析分离 (上海实生所三室等, 1979)。所有玻璃器皿和试剂 (除 oligo(dT) 外) 预先高压灭菌。称取 20 毫克总 RNA 溶解于 2 毫升起始缓冲液 (0.5M KCl, 0.01M Tris-HCl pH 7.5)，加入到预先用起始缓冲液平衡过的 oligo(dT)-纤维素夹套柱上 (1.0×20 厘米)，流出液联接核酸蛋白检测仪于 260nm 进行扫描。先用起始缓冲液洗脱，使第 I 峰洗脱完全后，立即升温至 54°C，继续洗脱，直到第 I 峰完全洗脱。调换缓冲液 (0.01M Tris-HCl pH 7.5) 洗脱，收集第 II 峰，经 Sephadex G-25 脱盐，冷冻干燥，即为 mRNA。

(2) mRNA 在 Sepharose 2B 柱上的层析分离 称取总 RNA 5-15 毫克，溶解于 20mM Tris-HCl pH 7.4, 0.15M NaCl, 1mM EDTA 和 0.5% SDS 缓冲液中，RNA 的浓度为 10 毫克/毫升，加入经该缓冲液平衡好的 Sepharose 2B 层析柱 (2.5×55 厘米)。继续用缓冲液洗脱，流速控制在 3—4 毫升/10 分钟，部分收集过程中用核酸蛋白检测仪于 260nm 扫描，最后分别测定每管 A₂₆₀ 光密度。合并第 I 峰各管 (光密度大于 0.10)，用二倍体积冷乙醇沉淀两次，其沉淀部分即为 mRNA。

3. 蓖麻蚕后丝腺 mRNA 的体外翻译 参考微生物所 (1976) 方法进行。全部操作在 4°C 进行，取 200 毫克“农大 139”小麦胚，加 200 毫克消毒的玻璃粉，在消毒研钵内加入缓冲液 (0.05M KCl, 1mM MgAc₂, 2mM CaCl₂ pH 7.5) 研磨 2 分钟，匀浆在 26000g 离心 20 分钟。吸取清液，加入到预先用缓冲液平衡好的 Sephadex G-25 柱，并用缓冲液洗脱，收集乳白部分，每毫升一管，测定 A₂₆₀ 和 A₂₈₀，其比值为 1.5 左右，即为 S₂₅。反应总体积为 100 微升，内含：Tris-醋酸 (2.5mM pH 8.0)；巯基乙醇 (2.2mM)；KCl (70mM)；MgAc₂ (2.5mM)；ATP (1mM)；GTP (0.025mM)；YtRNA (6 微克)；磷酸肌酸 50 微克；磷酸肌酸激酶 4 微克；19 种非标记氨基酸 (各 0.03mM)；³H-L-苯丙氨酸 (29ci/mM) 5 微居里；mRNA (0.15~0.20 O. D₂₆₀)，S₂₅ (50 微升)。混合后于 30°C 保温 60 分钟。然后移入冰浴冷却停止反应，取 40 微升反应液滴于滤纸片上，用 10% TCA 固定，5% TCA 洗涤，用酒精、乙醚洗涤后烤干，在液体闪烁仪上测定产物的放射活性。

4. mRNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳 依 Peacock 和 Dingman (1968) 方法，胶浓度为 2.0% 丙烯酰胺-0.5% 琼脂糖凝胶，电极缓冲液为 Tris-硼酸-EDTA (Na)，pH 8.3。电泳在 20°C 左右进行，时间为 1—2 小时，每管电流 3.5 毫安。用 2.0% 次甲基蓝染色。

结果和讨论

一、蓖麻蚕后丝腺和脂肪体 mRNA 在 oligo(dT)-纤维素柱上的分离

目前已知, 在真核细胞中, 绝大多数 mRNA 都存在多聚腺嘌呤核苷酸(Poly A)的顺序。利用碱基配对原理, PolyA 顺序与附着在纤维素上的寡胸腺嘧啶脱氧核苷酸oligo(dT)结合, 进行亲和层析, 而其他类型的 RNA 则不与上述物质进行这种结合。当用降低盐浓度洗脱时, mRNA 即被洗脱。我们采用 oligo(dT)-纤维素分离了蓖麻蚕后丝腺和脂肪体 mRNA, 结果见图 1 和图 2。由图可见, 第 I 峰为不被吸附的 RNA, 第 II 峰为非专一吸附到柱上的 RNA, 当温度升至 54°C 时, 即被洗脱下来。第 III 峰为专一性吸附, 在降低盐浓度时才被洗脱, 此峰即为 mRNA。脂肪体 mRNA 的分离也得到相似的结果。以上结果表明, 利用 oligo(dT)结合升温 and 降低盐浓度的方法, 使分离的 mRNA 峰形集中, 纯度高。聚丙烯酰胺-琼脂糖凝胶电泳也显示单一带(见图 3)。分离的 mRNA 占总 RNA 的 3.5—4.0% 左右。此层析峰形和兔珠蛋白 mRNA (张基增等, 1979) 及鲤鱼卵 mRNA (牛满江等, 1980) 相似。我们曾用降低盐浓度而不升温的方法, 一次分离不能完全除去被纤维素吸附的 rRNA, 往往需要进行第二次柱层析, 才能得到较纯的 mRNA。

二、蓖麻蚕后丝腺和脂肪体 mRNA 在 Sepharose 2B 层析柱上的分离

Sepharose 2B 分离 mRNA 是根据分子量的不同而达到分离。在家蚕丝心蛋白 mRNA 分离中得到了满意的结果(Suzuki, 1972)。我们利用 Sepharose 2B 分离蓖麻蚕后丝腺 mRNA, 结果见图 4。蓖麻蚕后丝腺 RNA 层析行为与家蚕基本上相同。这就提示

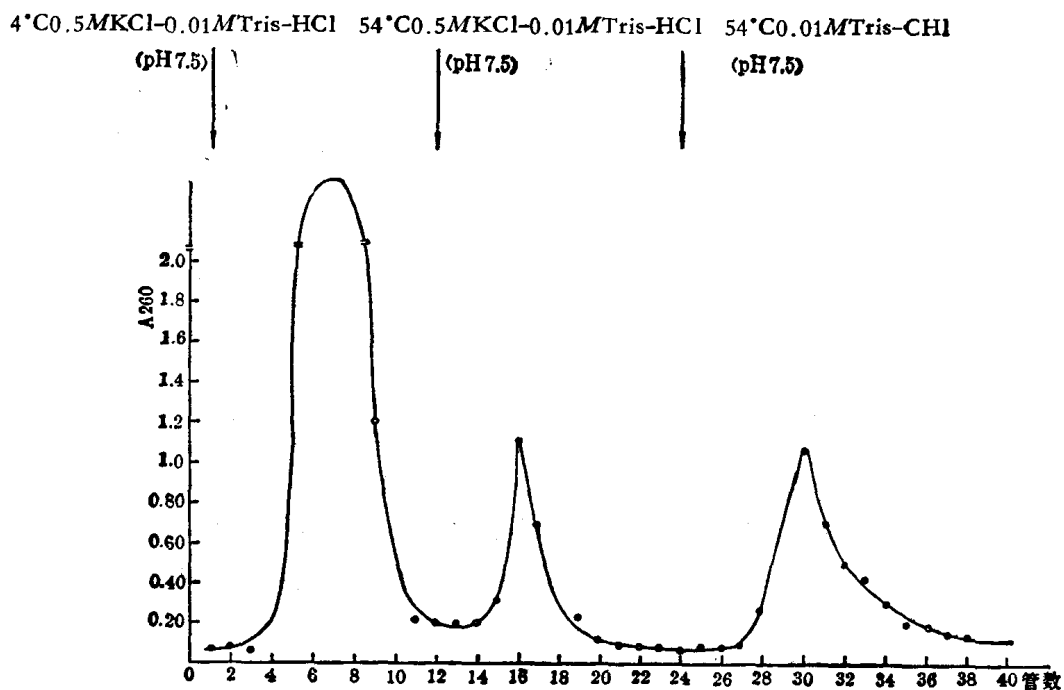


图 1 蓖麻蚕后丝腺 RNA 的 oligo(dT)-纤维素柱层析分离图谱

4°C 0.5M KCl-0.01M Tris-HCl (pH7.5)

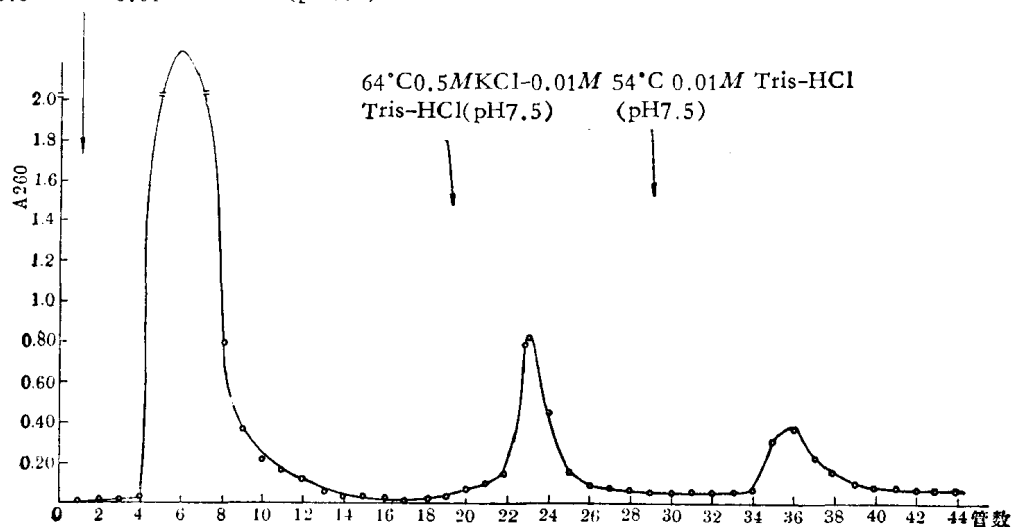


图2 蓖麻蚕脂肪体 RNA 的 oligo(dT)-纤维素柱层析分离图谱

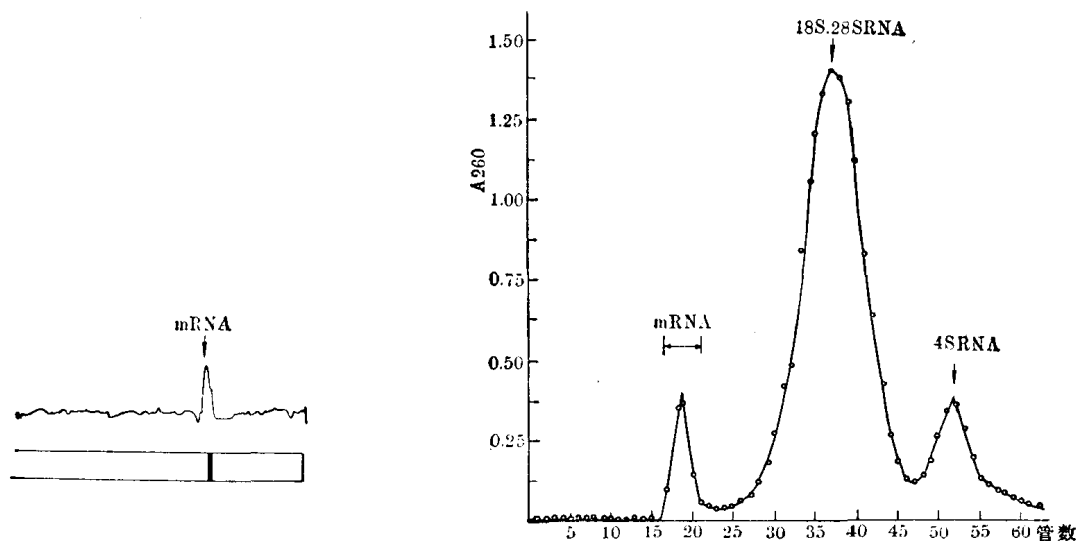


图3 蓖麻蚕后丝腺 mRNA 的凝胶电泳扫描图谱

图4 蓖麻蚕后丝腺 RNA 的 Sepharose 2B 柱层析分离图谱

上柱量总 RNA 为 5 毫克, 柱身 2.5×55 厘米

了第 I 峰为 mRNA, 类似于 50S 的家蚕 mRNA, 第 II 峰为 28S 和 18S, 第 III 峰为 4S。家蚕第 I、III 峰的相对大小是随着五龄期的时间而变化 (Suzuki, 1974, 1977)。因此这二个峰的高低不能表明两种蚕 mRNA 的差异。脂肪体 RNA 的分离, 按上述方法提取的 RNA 中, 仍含有少量的脂类物质, 当用 oligo(dT)-纤维素柱层析时, 可以避免脂类物质的干扰。但用 Sepharose 2B 分离时, 要用盐酸胍和乙醇抽提总 RNA, 去除脂类物质, 才能达到良好的分离效果。

三、蓖麻蚕后丝腺 mRNA 的生物活性测定

对于分离的 mRNA 一般通过测定其指导合成它所编码的那种蛋白质或多肽的生物

活性而进行鉴定。我们将 oligo(dT)-纤维素分离的后丝腺 mRNA 在麦胚无细胞体系中测定, 结果见表 1。由表 1 说明 mRNA 指导蛋白合成有 4.5 倍的活性。

表 1 蓖麻蚕后丝腺 mRNA 在麦胚提取物中活力测定

^3H -Phe 参 入 (cpm)		倍 数
空白对照	1198	
蓖麻蚕后丝腺 mRNA	5417	4.5
PolyU	16589	13.8

反应总体积为100微升, 内含丝腺 mRNA 6 微克;
丝腺 mRNA 的 $A_{260}/A_{280} = 1.4375$

同时用此分离的 mRNA, 在反转录酶催化下, 由 mRNA 反转录为 cDNA 的活性也被观察到。 ^3H -dATP 的参入对照为 200cpm, 后丝腺 mRNA 为 7000cpm, 血红蛋白 mRNA 为 12000cpm。上述结果表明, 用 oligo(dT)-纤维素分离的 mRNA 是具有翻译蛋白的活性和反转录 cDNA 的活性。

目前我们正进一步研究保幼激素类似物对丝腺细胞和脂肪细胞蛋白合成在翻译水平上的调节控制。

参 考 文 献

- [1] 许廷森、邹柏祥、林 浩、沈昭文。1980。昆虫激素调节控制的研究: 尿素循环问题和保幼激素类似物对精氨酸酶的调节控制。生物化学与生物物理学报, 12 (4): 313—19。
- [2] 林 浩、戴祝英、邹柏祥、许廷森。1980。昆虫激素调节控制的研究: 保幼激素类似物对蚕合成甘氨酸和丙氨酸有关酶系的调节控制。生物化学与生物物理学报, 12 (4): 321—29。
- [3] 上海实生所三室、上海试剂二厂核酸组。1977。Oligo(dT)-纤维素与 oligo(u)-纤维素的合成及其应用。生物化学与生物物理进展, 4: 8—11。
- [4] 张基增、钱若兰。1979。珠蛋白 mRNA 的分离及其在麦胚无细胞系统中指导珠蛋白的合成。细胞生物学杂志, 1 (1): 34—38。
- [5] 牛满江、于建康、宋德秀。1980。鲤鱼卵信使核糖核酸 (mRNAs) 中指导肝脏白蛋白合成的组分。中国科学, 4: 370—75。
- [6] 中国科学院微生物所病毒复制组。1976。小麦胚无细胞体系中 TMV-RNA 指导的氨基酸参入。生物化学与生物物理学报, 8 (2): 179—86。
- [7] Greene, R. A., Mogan, M., Shatkin, A. J. and Gage, L. P. 1975 Translation of silk fibroin messenger RNA in an Ehrlich ascites cellfree extract. *J. Biol. Chem.* 250 (13): 5114—5121。
- [8] Price, G. M. 1973 Protein and nucleic acid metabolism in insect fat body. *Biol. Rev.* 48: 333—375。
- [9] Peacock, A. C. and Dingman, C. W. 1968 Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels. *Biochem.* 7 (2): 668—674。
- [10] Suzuki, Y. and Brown, D. D. 1972 Isolation and identification of the messenger RNA for silk fibroin from *Bombyx mori*. *J. Molec. Biol.* 63: 409—429。
- [11] Suzuki, Y. and Suzuki, E. 1974 Quantitative measurements of fibroin messenger RNA synthesis in the posterior silk gland of normal and mutant *Bombyx mori*. *J. Molec. Biol.* 88: 393—407。
- [12] Suzuki, Y. 1977 Differentiation of the silk gland. A model system for the study of differential gene action. in "Biochemical Differentiation Insect Glands" (W. Beermann ed.) pp19—31. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York。

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE MESSENGER
RNA OF SILK FIBROIN AND FAT BODY FROM
PHILOSAMIA CYNTHIA RICINI

Tsou Bai-shiang Lin How

(Shanghai Institute of Entomology, Academia Sinica)

Lin Bing-hui

(Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica)

Hsu Ting-seng

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

In the present paper it was shown that the mRNA in the posterior division of silkgland and fat body of *Philosamia cynthia ricini* was prepared and isolated by using oligo(dT)-cellulose and sepharose 2B column chromatography. The fibroin mRNA accounts for 3.5–4.0% of the total RNA. The activity of the fibroin mRNA which stimulates the incorporation of ^3H -L-Phenylalanine was determined in a wheat embryo cell-free system. The translational activity of the mRNA is 4.5 times higher than the control. Furthermore, the fibroin mRNA can be transcribed into complementary DNA *in vitro* by the reverse transcriptase.

昆虫激素调节控制的研究: β -蜕皮素对家蚕谷丙转氨酶和谷天转氨酶的作用

崔 征

许廷森

(中国科学院上海昆虫研究所)

(中国科学院上海生物化学研究所)

蜕皮激素是昆虫体内的一种极其重要的激素。它在脑神经及脑激素的控制下与保幼激素等协调作用,调节控制昆虫的生长、发育、变态和蜕皮等生理过程。在蚕业生产上也用蜕皮激素来缩短龄期,减少蚕的食桑量,甚至增加蚕丝产量。(周维善,1980)。蜕皮激素对昆虫体内许多重要器官和组织有明显的生理效应。自从 Karlson 发现蜕皮激素对多巴脱羧酶的诱导作用(1976; 1962),以及蜕皮激素引起膨突现象(Karlson等,1960; 1966)后,对于蜕皮激素的生化机制的研究愈来愈引起人们的兴趣。研究蜕皮激素对酶分子的诱导合成是研究其作用机制的一个重要方面。

脂肪体和丝腺是家蚕体内非常重要的两大器官。脂肪体是家蚕体内新陈代谢的枢纽,其作用之重要可以和哺乳动物的肝脏相比。在脂肪体中,糖、脂类、蛋白质和核酸的代谢极为旺盛。五龄幼虫时,整个蚕体中的代谢都是围绕吐丝营茧及幼虫化蛹等生理过程作准备。这时丝腺的主要作用就是合成大量的丝心蛋白,丝腺在五龄相当一段时间内进行着极为旺盛的各种核酸和蛋白质的生物合成。

氨基酸代谢与蛋白质生物合成紧密相关。它为蛋白质生物合成提供了所需的氨基酸,特别是蛋白质内所含的主要氨基酸与其代谢有关的酶关系十分密切。家蚕丝心蛋白中含有30%左右的丙氨酸,仅次于甘氨酸的含量(约40%)(钱国祗等,1980)。关于蜕皮激素对五龄期间丝心蛋白中丙氨酸合成有关的谷丙转氨酶和谷天转氨酶的影响,从而增加丙氨酸的含量而影响丝心蛋白的合成,这对于保幼激素与蜕皮激素协同应用于蚕业增产具有重要的理论和实际意义(许廷森等,1979; 林浩等,1980; 周维善等,1980)。

为此,我们观察了 β -蜕皮素对五龄家蚕脂肪体和后部丝腺中的谷丙转氨酶、谷天转氨酶活力的影响,发现 β -蜕皮素作用于五龄早期家蚕,可以明显提高这两个酶的活力; β -蜕皮素在五龄晚期处理家蚕,则可使以上两个酶的活力维持在较高水平。此外,还结合偶联乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶的酶促方法,观察了五龄期间这两种酶活力的变化。

材料与方 法

一、蚕

家蚕品种: 苏3 × 苏4, 由中国农业科学院镇江蚕业研究所供应。

二、 β -蜕皮素及其对家蚕的处理

β -蜕皮素为中国科学院上海有机化学研究所自露水草中提取的纯品。先用少量酒精将 β -蜕皮素溶解，再加 0.05M, pH7.5 的磷酸缓冲液，稀释到 β -蜕皮素的浓度为 200 微克/毫升。

β -蜕皮素对五龄家蚕的早期处理：实验用蚕为五龄刚开始饲食的蚕。用打孔器将桑叶打成直径为 1 厘米的圆片，用微量注射器将 β -蜕皮素溶液涂布在打好的桑叶片上。剂量为每头 4 微克，限定在 3 小时内分别使蚕摄食完所给桑叶片。摄食完的蚕，方可用于实验。

β -蜕皮激素对五龄家蚕的晚期处理：实验用蚕为五龄饲食后 136 小时的蚕。用微量注射器以上述相同浓度的 β -蜕皮素溶液从家蚕的口腔注入体内。剂量为每头 4 微克。每实验组用蚕为雌雄各半。

三、试剂

本实验所用各种氨基酸、乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶及还原辅酶 I，均为中国科学院上海生化所东风生化试剂厂生产。

四、蛋白质含量的测定

本实验均采用 Folin-酚试剂法 (Lowry, O. H. 等, 1951)。

五、各种转氨酶的测定

酶液的制备：取出家蚕后部丝腺和脂肪体，用冰冷的 0.05M、pH7.5 磷酸缓冲液洗涤数次，然后脂肪体以 1:10 体积，丝腺以 1:8 体积对上述缓冲液匀浆。然后以 3500 转/分转速离心 15 分钟，取上清液测定酶活力。

谷天转氨酶和谷丙转氨酶的测定：分别用乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶，以及还原辅酶 I，在 340 毫微米处测定光吸收的变化。这两个酶的测定分别参照了 Chen 等的方法，并进行了改进 (林浩等, 1980)。酶活力以每毫克蛋白每分钟变化的 OD 数计算。

结果与讨论

一、五龄家蚕脂肪体与丝腺中谷丙转氨酶与谷天转氨酶的变化

谷丙转氨酶是体内利用丙酮酸通过转氨作用生成丙氨酸的关键酶，对于昆虫体内大多数器官组织中蛋白质代谢有着重要意义 (许廷森等, 1963; 1964; 邹柏祥等, 1979)。而且对于五龄家蚕的丝腺来说其意义就更重大。因为合成的丙氨酸是丝心蛋白中主要的氨基酸之一。桑叶中含大量的天门冬氨酸，它可以通过谷天转氨酶和谷丙转氨酶的联合作用，以及草酰乙酸的脱羧作用，均可合成大量的丙氨酸 (许廷森等, 1964)。因此观察谷丙转氨酶和谷天转氨酶的活力是丙氨酸生物合成的重要指标之一。本实验观察到饲食后六小时所测定的以上两个酶的活力都较刚饲食时的酶活力有所下降，而后酶活力再逐渐回升。四龄眠时；蜕皮激素引起蜕皮，同时可诱导一些酶的合成，其中除多巴脱羧酶外 (Karlson 等, 1962; 1976)，可能也包括谷丙转氨酶和谷天转氨酶，所以在饲食前，一般地说它们的活力都相应地比较高，尤其是脂肪体中的谷丙转氨酶和谷天转氨酶 (见表 1)。饲食后，两个酶的活力均有所下降 (见表 1)。实验结果还表明在家蚕丝腺中谷