

# 昆虫分析 生物化学

[美] R. B. 特纳 编

405  
r

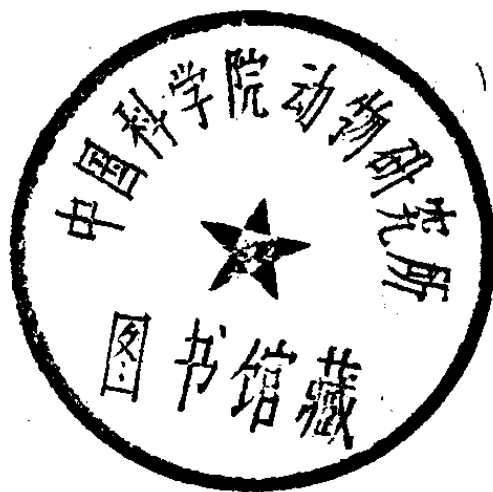
科学出版社

ZK10/13  
昆虫分析生物化学

〔美〕R. B. 特纳 编

李丽英 等 译

符文俊 校



科学出版社

1984

15034

## 内 容 简 介

原书由 Ralph B. Turner (1977) 编纂出版,包括:核苷、核苷酸及有关化合物的分析;昆虫 DNA 的生物化学分析;RNA 的制备及分析;氨基酸、肽及有关化合物的分析;昆虫类脂的分析;昆虫蜕皮激素的化学分析;昆虫保幼激素的分析;昆虫神经传递质及其酶系的生物化学分析等共八章,介绍了昆虫生物化学分析这些方面广为采用的各种新近的技术和具体操作方法,可供昆虫学工作者及有关大专院校师生参考。

Ralph B. Turner editor

Analytical Biochemistry of Insects

Elsevier Scientific Publishing Company 1977

### 昆虫分析生物化学

[美] R. B. 特纳 编

李丽英 等 译

符文俊 校

责任编辑 娄朋逊

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1984 年 8 月第 一 版 开本:787×1092 1/32  
1984 年 8 月第一次印刷 印张:9 3/4  
印数:0001—6,000 字数:223,000

统一书号:13031·2658

本社书号:3658·13—7

定价: 1.55 元

## 译 者 的 话

随着现代科学技术的进步,昆虫生物化学也在迅速发展,在这个发展进程中,实验分析方法的改进,先进技术和仪器的采用起了重要的推动作用。

我们翻译了《昆虫生物化学分析》一书,希望对我国从事昆虫生物化学分析工作的同志能有所帮助。

由于我们水平不高,又未直接参加过各项实际操作,再加上是七人集体翻译,因此,不统一的地方,甚至错误之处在所难免。我们恳切希望读者批评指正。

译者

1981年2月

# 序 言

虽然有许多许多有关生物化学物质分析的书，但是对昆虫组织来说，还要克服各种障碍才能有效地应用微生物或脊椎动物组织的常规方法。本书提供了适用于昆虫组织的成功的方法。为了使这些方法的应用叙述得详尽，以便初学者和有经验的研究者们都能同样做到现代生化操作上的严格要求，本书著者参考了大量文献，并且广泛地总结了他们自己的经验。

用常规方法分析昆虫碳水化合物并不存在特殊问题，因此，碳水化合物的分析没有收入本书之内。然而应该知道，“活的分析方法学”(C. A. Lang 等, 43 页)如同分析其它生物化学物质一样，也必定要分析碳水化合物。

我很感谢本书各著者的协作和他们对有关内容的质量及其准确性的关心。

R. B. 特纳

# 目 次

序言.....	iii
第一章 核苷、核苷酸及有关化合物的分析.....	1
第二章 昆虫 DNA 的生物化学分析 .....	27
第三章 RNA 的制备和分析 .....	74
第四章 氨基酸、肽及有关化合物的分析.....	124
第五章 昆虫类脂的分析.....	158
第六章 昆虫蜕皮激素的化学分析.....	200
第七章 天然保幼激素的分析——分离、鉴定以及生理 水平上的浓度测定.....	226
第八章 昆虫神经传递质及其酶系的生物化学分析.....	279

# 第一章 核苷、核苷酸及有关化合物的分析

N. Mitlin

- |               |                           |
|---------------|---------------------------|
| 一、引言          | 2. 环核苷酸的分离                |
| 二、样品的制备——一般步骤 | 3. 检定步骤                   |
| 三、核苷的分析       | 五、嘌呤的分析                   |
| 1. 抽提步骤       | 1. 抽提步骤                   |
| 2. 分离方法       | 2. 尿酸、鸟嘌呤、黄嘌呤和 6-羟基黄嘌呤的分离 |
| 3. 定量测定       | 3. 测定步骤                   |
| 四、核苷酸的分析      | 参考文献                      |
| 1. 游离核苷酸的分离步骤 |                           |

## 一、引言

虽然分析核苷、核苷酸及有关化合物的方法在文献里有了很多介绍，但旨在研究昆虫或适用于研究昆虫的分析方法却相对地少。很少昆虫生物化学家或生理学家采用已发表的一些其它生物的分析方法而没有获得成功的。

即使很多用于其它生物的方法或许也适用于昆虫，但在本章里我们只介绍那些已被证实适用于昆虫的分析方法；同时，考虑到各实验室设备的不同，我们尽可能选择那些不同情况的研究者都能采用的方法。显然，这不是全面的概括，然而所选择的这些方法至少对一种昆虫已得到成功的验证。

所用缩写

Ado = 腺苷	G 6PDH = 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶
ADP = 二磷酸腺苷	HK = 己糖激酶
AMP = 单磷酸腺苷	HMP = 磷酸己糖
ATP = 三磷酸腺苷	Methyl de Cyt = 甲基脱氧胞嘧啶
Cyt = 胞嘧啶	Pseudo-Urd = 假尿核苷
de Ado = 脱氧腺苷	Thy = 胸腺嘧啶核苷
de Guo = 脱氧鸟嘌呤核苷	TPN = 三磷酸吡啶核苷酸
deo Urd = 脱氧尿核苷	TPNH = 还原三磷酸吡啶核苷酸
Guo = 鸟嘌呤核苷	Urd = 尿核苷
GMP = 单磷酸鸟嘌呤核苷	

## 二、样品的制备——一般步骤

研究者着手制备组织样品时，立即就面临如何把由于离体或酶作用而引起的降解作用或其它生物学变化减少到最低程度的问题。分析环核苷酸时，这个问题尤需注意。大多数人采用立即冷冻的办法，有人用液体氮，也有人用二氯二氟甲烷(氟利昂 12)<sup>[1]</sup>。为了获得液体氟利昂，需要把这种致冷剂瓶倒转，倾入一只小烧杯，然后悬挂于充氮的杜瓦(Dewar)瓶里，组织样品浸入氟利昂内，并贮存于-35℃以下<sup>[2]</sup>。原著者主张解剖和称重的的工作也在-20℃下进行。

很多研究者喜欢用高氯酸做抽提溶剂<sup>[3,4,5]</sup>，使用浓度为0.4—0.6N，在低温下用玻璃匀浆器磨研组织并离心3—4次，所得上清液合并，用氢氧化钾溶液中和，由此生成的高氯酸钾通过离心除去。假若用阴离子交换法分离核苷酸，溶液应该在酸性条件下用活性炭处理，以除去过量的电解物。核苷酸可以用1%氨的乙醇(60%)溶液或10%吡啶的乙醇(50%)溶液洗提<sup>[6]</sup>，这样，要分离的含核苷酸的溶液就准备好了。

为辐射免疫试验而制备的组织,如同黄猩猩果蝇 (*Drosophila melanogaster*)<sup>[7]</sup> 的处理一样,可用 1N 高氯酸匀浆,离心 5 分钟 (15,000 转/分),将沉淀出来的蛋白和其它不溶性物质舍弃,上清液用碳酸钾 (6.6M) 中和,离心后舍弃沉淀物,然后把 5 毫克琥珀酸酐和 10 微升三乙胺加到 100 毫升上清液使核苷酸琥珀酸酐基化,将此混合物剧烈振荡 10 分钟。

Fallon 和 Waytt<sup>[8]</sup> 采用了另外的方法制备柞蚕 (*Antheraea Pernyi*) 的用作环核苷酸分离的样品,他们在 0°C 下用乙醇-盐酸 (无水乙醇 60 份,盐酸一份) 将组织匀浆,离心 10 分钟 (12,000g)。上清液在室温下真空蒸发,类脂物质用下法除去: 将组织残渣悬浮于 1.0 毫升、50mM 的醋酸钠溶液 (pH 4.0),用饱和水的乙醚抽提,再将乙醚除去,所得的水溶性样品即可备用。

### 三、核苷酸的分析

对昆虫核苷的研究是有限的,在为数很少的报道中,分离和测定核苷酸有用纸层析,也有用薄板层析。例如对惜古比天蚕蛾 (*Hyalophora cecropia*) 的包括 DNA 生物合成的一系列研究<sup>[9,10,11]</sup>中,各种核苷是用纸层析分离的。Forest 等<sup>[12]</sup>研究乳草蜻 (*Oncopeltus fasciatus*) 也采用了相同的方法。

#### 1. 抽提步骤

除了上面已经详述的步骤之外,还增加了一些步骤: 方法 1) 的卵可以直接压碎在层析纸上<sup>[12]</sup>,或者用乙醇-吡啶-水 (5:1:4V/V) 抽提组织,但使用之前,抽提物要浓缩。

核苷可以直接以酶反应混合物分离,其中含 0.2 毫升惜古比天蚕蛾匀浆 (用水匀浆)、20 微克分子 tris (三羟甲基氨

基甲烷)缓冲剂(pH7.5)、1.5微克分子ATP、8微克分子肌酸磷酸盐、10微克肌酸磷酸酶、8克分子氯化镁( $MgCl_2 \cdot H_2O$ );加70%的甲醇使反应停止。

## 2. 分离方法

### 纸层析法

1) 层析纸: Whatman #3 (惠特曼3号滤纸)。

溶剂系统: 正-丙醇-1%氨水(2:1)。被分离的核苷是肌苷和鸟嘌呤核苷<sup>[12]</sup>。

2) 层析纸: Whatman #1。

溶剂系统: 异-丁酸-1M 氢氧化铵-0.2M 乙二胺四醋酸钠(50:30:0.5V/V)。

斑点用短波紫外光定位。在方法2)中,斑点放入70%乙醇洗脱,浓缩,在Whatman 1号滤纸上再次纸层析,用水做溶剂,分离出来的核苷是脱氧肌苷、脱氧鸟嘌呤核苷和脱氧黄质核苷。单磷酸脱氧腺苷核苷酸和单磷酸脱氧鸟嘌呤核苷核苷酸也被分离出来<sup>[13]</sup>。用下面将要详细介绍的 Krzyanowska 和 Nemierko 纸层法<sup>[14]</sup>也可以分离出尿酸核糖苷。

### 薄板层析法:

1) 底物: 发光纤维素(Schleicher 和 Shull 公司出品)<sup>[15]</sup>。

溶剂系统: 0.1M 甲酸铵(pH5.3)。用短波紫外光进行核苷斑点的定位。作者通过6种溶剂系统的层析和不同pH值洗脱液的光谱分析,验证了核苷的一致性,用分光光度计定量。

2) 底物: a. 微晶格纤维素(Avicel); b. DEAE-纤维素(二乙基氨基乙基-纤维素)。Moriuchi 等<sup>[16]</sup>采用此法对家蚕(*Bombyx mori*)进行了研究<sup>[17]</sup>。

底物的制备: a. 微晶格纤维素: 取30克商品级纤维素悬浮于500毫升5mM 维尔烯(Versene), 摇荡10分钟,用布

(Buchner) 氏漏斗过滤,用蒸馏水洗,再重复维尔烯处理,将纤维素悬浮于 150 毫升蒸馏水,在真空下除去气体,振荡悬浮液,直至匀浆形成。b. DEAE-纤维素: 取 20 克 DEAE 纤维素悬浮于 500 毫升 0.5N 盐酸,在室温下机械搅拌 30 分钟,将纤维素收集到布氏漏斗,用水洗至中性,再将粉末悬浮于 500 毫升 5N 盐酸,搅拌 30 分钟,过滤,依前法水洗,然后将此纤维素悬浮于 200 毫升水,真空除去气体,将此悬浮液振荡,直至匀浆形成。

无论那一种底物,都可以用下面的溶剂系统: a. 异丙醇-盐酸-水 (65:16.7:18.3V/V); b. 异丁酸-水-25% 氢氧化铵 (400:208:0.4V/V); c. 异丙醇-水-28% 浓氢氧化铵(85:15:1.3V/V); d. 正丁醇-水-甲酸 (77:13:10V/V); e. 饱和硫酸铵-1M 醋酸钠-异丙醇 (80:18:2V/V)。

用双向层析法(表 1-1 中的溶剂系统)所得的结果最好。

表 1-1 市售微型结晶状纤维素层析所得核苷的  $R_f$  值

核 苷	溶 剂				
	a	b	c	d	e
腺苷	0.23	—	—	0.41	—
脱氧腺苷	0.27	0.82	0.37	0.42	0.09
胞嘧啶	0.36	0.65	0.27	—	0.52
脱氧胞嘧啶	0.50	0.65	0.35	—	0.47
甲基脱氧胞嘧啶	0.59	0.73	0.40	0.42	0.39
鸟嘌呤核苷	0.22	0.50	0.09	0.26	0.27
脱氧鸟嘌呤核苷	0.14	0.59	0.17	0.36	0.23
尿核苷	0.62	—	—	—	—
脱氧尿核苷	0.77	0.61	0.33	0.47	0.45
胸腺嘧啶核苷	0.88	0.66	0.52	0.55	0.37
假尿核苷	0.42	0.42	0.08	0.24	0.57

各溶剂迁移所需时间因长度和温度而不同,本表采用的是 2 小时的平均值。(引自 Gripp *et al*<sup>[16]</sup>)

### 3. 定量测定

核苷量的计算方法是在紫外光下圈出其斑点，并刮下来放入试管，加入 0.1N 盐酸，所得的匀浆放置过夜，用微型烧结玻璃漏斗过滤，用紫外分光光度计在不同消光值下( $\lambda$  最大— $\lambda$  最小)测出溶液的各个  $E$  值<sup>[41]</sup>。这些系统也可以分离核苷酸。

## 四、核苷酸的分析

### 1. 游离核苷酸的分离步骤

凹形梯度系统：用凹形梯度洗提系统<sup>[18]</sup>和类似于 Pontis 和 Blumson<sup>[19]</sup>的混合系统，有效地分离出杂拟谷盗(*Tribolium confusum*) 蛹的核苷酸<sup>[5]</sup>。

材料：

- 1) 离子交换树脂：AG1-X4 苯乙烯型，季铵 (calbiochen 公司出品)，200—400 目；
- 2) 玻璃柱(44 × 1.3 厘米)；
- 3) 和玻璃柱相配的烧结玻璃盘；
- 4) 1N 氢氧化钠、1N 盐酸；
- 5) 0.15N 氯化锂、0.16N 氯化锂、0.19N 氯化锂；
- 6) 0.001N 盐酸、0.01N 盐酸。

方法

柱的制备：先用 1N 氢氧化钠洗涤离子交换树脂，再用 1N 盐酸洗，再重复一次，然后用水洗，直至 pH 在 5 左右；装柱，装树脂的高度为 32 厘米。

洗脱：利用一套贮存——混合瓶装置中的凹梯度进行。方法是取两只高 30 厘米、直径分别为 8.6 和 5.5 厘米的玻璃瓶，彼此平行放置，两瓶基底部用一根短的聚乙烯管连通，大

玻璃瓶底部装上磁搅拌棒,所用溶液如下:

贮存瓶	混合瓶
A. 715 毫升 0.15N 氯化锂 溶于 0.001N 盐酸	A'. 1685 毫升 0.001N 盐酸
B. 400 毫升 0.16N 氯化锂 溶于 0.01N 盐酸	B'. 940 毫升 0.15N 氯化锂 溶于 0.001N 盐酸
C. 400 毫升 0.19N 氯化锂 溶于 0.01N 盐酸	C'. 940 毫升 0.16N 氯化锂 溶于 0.10N 盐酸

著者在分离已知核苷酸中,三种洗提液都用过了,但因为杂拟谷盗蛹抽提物含核苷酸量很少,所以分离蛹抽提物时 B-B' 系统没有使用。

开始时,贮存瓶和混合瓶分别盛满淋洗液 A 和 A', 让淋洗液从贮瓶流到混合瓶再到柱,当两个瓶中的淋洗液快要流尽时,按先后盛入 B-B' 和 C-C'。

从柱流出的淋洗液的浓度可按 Bock 和 Ling<sup>[20]</sup> 法计算。各馏分可收集到 5 毫升的收集器中,用记录分光光度计(253.7 毫微米)记录其浓度。为更加精确起见,各馏分可用分光光度计(260 毫微米)再测一次。各核苷酸的鉴定可根据其洗脱图和吸收光谱来确定。

柱系统: 这个系统用于分离惜古比天蚕蛾<sup>[4]</sup>和家蝇(*Musca domestica*)<sup>[21]</sup>的核苷酸。

材料:

1) 离子交换树脂: Dowex 1 × 10 甲酸盐型和 Dowex 50 × 12H;

2) Dowex 1: 柱 3—10 毫米 × 18—25 厘米; Dowex 50: 柱大约两倍于 Dowex 1 的容积;

3) 蒸馏水;

4) 2N 甲酸, 4N 甲酸-1N 甲酸铵;

5) 0.02N 盐酸, 0.2N 盐酸。

方法: 在 Dowex 1 柱上, 核苷酸用水→2N 甲酸→4N 甲酸-1N 甲酸铵作梯度洗脱(回收  $98 \pm 5.6\%$  S. D)。Dowex 50 柱用于碱性磷酸盐; 相继用水, 0.02N 盐酸和 0.2N 盐酸洗脱。

在室温下的甲酸盐系统中, 电泳纯化的 ATP 样品没有水解物生成。作者<sup>[4]</sup>还报道了他们对离子交换分离的馏分用纸层析法作进一步的分离和鉴定(见纸层析部分)。

## 2. 环核苷酸的分离

柱系统: 从蟋蟀 (*Acheta domesticus*) 组织分离的环单磷酸腺苷 (AMP) 和环单磷酸鸟嘌呤核苷 (GMP) 的制备法见样品制备部分<sup>[8]</sup>。

材料:

- 1) 玻璃柱  $0.7 \times 3$  厘米;
- 2) Dowex-I 树脂, 甲酸酯型, 用蒸馏水平衡, 用 10 毫升蒸馏水洗;
- 3) 2M 甲酸, 4M 甲酸。

方法: 洗脱环 AMP 用 14 毫升 2M 的甲酸, 洗脱环 GMP 用 18 毫升 4M 的甲酸。将洗提物冷冻真空干燥, 将此环核苷酸溶于 0.75—1.50 毫升蒸馏水。作者估计回收率为 75—80%。

环核苷酸的平衡透析<sup>[22]</sup>:

材料:

- 1) 具 10 个  $2 \times 200$  微升透析室的透析箱一个;
- 2) 免疫血清(见检定部分);
- 3) 柠檬酸盐缓冲剂, 0.1M, pH6.2;
- 4) 人血清白蛋白;
- 5) 罂粟碱,  $2.5 \times 10^{-4}$ M;

- 6) 碘  $^{125}\text{I}$ -2'-O-琥珀酰基环 AMP 酪氨酸甲酯 ( $^{125}\text{ISCAMPTE}$ );
- 7) 碳  $^{14}\text{C}$ , 3', 5' 环 AMP;
- 8) 2'-O-琥珀酰基环 AMP (SCAMP)<sup>[23]</sup>;
- 9) 琥珀酰;
- 10) 三乙胺;
- 11) 抗 3', 5' 环 AMP 抗体<sup>[22]</sup>。

方法:

1) 平衡透析——常规方法是用一个具 10 个  $2 \times 200$  微升透析室的透析箱<sup>[23]</sup>, 如果要求更高的灵敏度, 则可以用有  $2 \times 20$  微升透析室的。检定时, 一个室盛适当稀释的免疫血清(通常为 1/16,000)其它室盛  $^{125}\text{ISCAMPTE}$  (约 10,000CPM,  $2.5 \times 10^{-5}$  克分子)加无标记的核苷酸, 全部产物稀释于 0.1M 柠檬酸盐缓冲剂(pH 6.2)加 1 克/升人血白蛋白和  $2.5 \times 10^{-4}\text{M}$  罂粟碱, 在  $4^\circ\text{C}$  下 20 小时获得平衡, 每室取 10 微升作放射性测定。在免疫血清一侧, 相当于结合和游离  $^{125}\text{ISCAMPTE}$  的总和 (T), 另一侧相当于游离  $^{125}\text{ISCAMPTE}$ 。结合的比率按下式计算:  $I = B/T$ ,  $B = T - F$ 。

小心校正的环状 AMP 和 SCAMP 标准溶液的典型曲线见图 1-1, 这将用于未知样品的放射免疫测定。

2) 琥珀酰化作用: 取 100 微升上清液加 5 毫升琥珀酰和 10 微升三乙胺, 用力振荡 10 分钟。

环状核苷酸的薄层分离步骤

天蚕蛾 (*Hyalophora gloverii*) 蛹的环 GMP 和环 AMP 都已用薄层析分离了出来<sup>[24]</sup>。

材料:

1) 薄层板 ( $5 \times 20$  厘米)涂以含有惰性粘合剂加黄磷的硅胶;

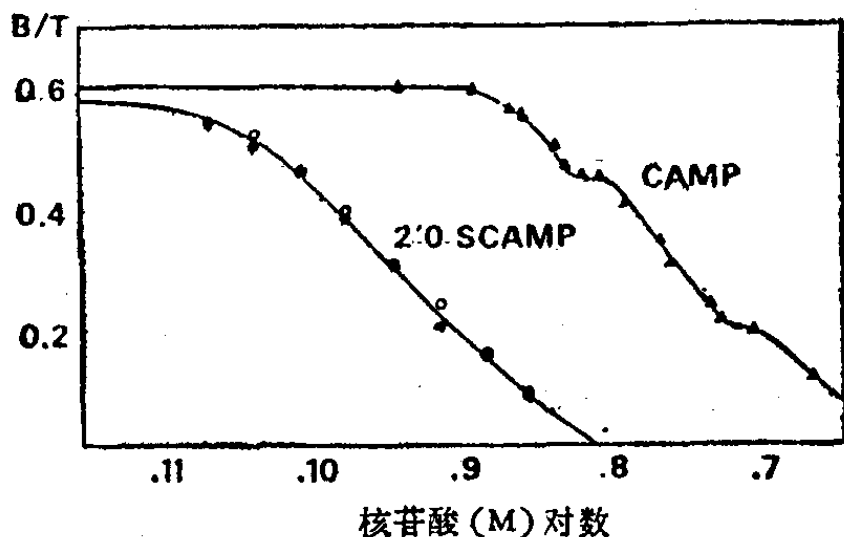


图 1-1 2'-O-SCAMP 和 CAMP 代替  $^{125}\text{I}$ -SCAMPTME 曲线。

免疫兔血清稀释到 1/16,000, 根据结合  $^{125}\text{I}$ -SCAMPTME/结合+游离  $^{125}\text{I}$ -SCAMPTME 的比值对核苷酸对数绘图。

2) 薄层溶剂槽;

3) 溶剂系统;

a. 异丙醇-醋酸乙酯-浓氢氧化铵-水(55:29:12:4V/V)。

b. 异丙醇-醋酸乙酯-浓氢氧化铵-水 (30:50:12:18V/

V)。

方法: 分离环 AMP 用 5% 三氯乙酸的组织匀浆抽提物点在薄层板上, 在溶剂 a 中展开; 分离环 GMP 则用溶剂 b; 按常用方法标记。

研究工作者用本法去分离从薄板刮下来的具有放射活性的核苷酸, 用闪烁计算机计算。

### 3. 检定步骤

环 GMP 的结合蛋白检定步骤<sup>[8]</sup>

材料: -

1) 磷酸盐-EDTA(乙二胺四乙酸)缓冲液 (pH7.0); 含 2mM EDTA 的 5mM 磷酸钾;

2) 磷酸盐-EDTA 缓冲液 (pH 7.2); 含 2mM EDTA 的 1M 磷酸钾;

3) 醋酸钠缓冲液: 5mM (pH 4.0);

4) EDTA: 4mM;

5) 乙酸: 1N;

6) 硫酸铵;

7) 用氘标记的 GMP。

结合蛋白的制备: 除去柞蚕蛹的脂肪体用林格氏溶液洗三次, 在布氏漏斗上(不用滤纸)轻轻旋转, 以便除去水份, 用此新鲜或冰冻组织做结合蛋白的分离<sup>[26]</sup>。

用 3—4 倍于组织体积的 4 mM EDTA 将组织匀浆, 冷冻离心 30 分钟(离心速度 27,000 g), 搅拌下用冰冻之 1 N 醋酸将上清液调到 pH 4.8, 让酶溶液静置 10 分钟, 离心除去沉淀, 用含 2 mM EDTA 之 1M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.2) 将上清液调到 pH 6.8。所得上清液加固体硫酸铵 (33 克/100 毫升), 搅拌 20 分钟, 离心, 收集沉淀, 溶于用 5 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0; 含 2 mM EDTA) 来抽提的粗提物中, 将所得的溶液倒入 20 倍同样缓冲剂中进行透析, 放置过夜, 当中要更换两次缓冲液(缓冲液超过 20 倍可引起沉淀); 透析后, 离心 30 分钟 (27,000g), 倒掉上清液。

试验: 用于检定环状 GMP 的总体积为 0.10 毫升, 内含 5 微克分子醋酸钠 (pH 4.0)、1 微微克分子用氘标记的 cGMP、未知样品或标准样品的水溶液。把各试管冷却到 0℃。(以后处理均在冰浴下进行), 加入 420 微克结合蛋白, 静置 1.5 小时, 加 10 微升牛丙种球蛋白的 EDTA 磷酸酯溶液 (10 毫克/微升) 使反应停止<sup>[27]</sup>, 再加 1 毫升饱和硫酸铵, 按照常规, 加硫酸铵前载体应先加到 8—10 只试管, 混合后, 静置 10 分钟使沉淀完全, 在 16,000g 下离心 10 分钟, 吸出上清液, 再