应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2013,50(6):1753 - 1759. DOI:10.7679/j.issn.2095 - 1353.2013.239

其他技术与方法

棉铃虫围食膜蛋白的电泳分离技术*

李怡萍[1**] 仵均祥[1] 梁革梅[2] 郭予元[2] 袁向群[1***]

(1. 西北农林科技大学植物保护学院 应用昆虫学重点实验室 杨凌 712100;
2. 中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100193)

摘 要 比较了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner)围食膜不同处理方法,不同围食膜数量,在不同电泳下的分离效果,筛选最佳的围食膜蛋白分离技术。结果表明:冷冻干燥与非冷冻干燥处理围食膜后进行 SDS-PAGE 电泳分离效果基本相同,建议使用冷冻干燥后处理较好。取 1、3、5 条围食膜进行 SDS-PAGE 电泳,都能将围食膜蛋白分离,且分离效果基本一致,建议 5 条围食膜最合适,具有可靠性和代表性。浓缩胶为 5%、分离胶分别为 8%、10% 和 12% 时棉铃虫围食膜的 SDS-PAGE 电泳分离效果差异不大,而分离胶为 12% 时效果较好。无水三氟利克酸处理围食膜后进行 NuPAGE 电泳,分离出的围食膜蛋白大约 30 多种,远远超过上述方法分离的 16 ~ 20 种,且需要的围食膜材料少,分离效果最佳,但费用高。

关键词 棉铃虫, 围食膜蛋白, 分离, 电泳技术

Electrophoretic techniques for the separation of peritrophic membrane proteins from *Helicoverpa armigera*

LI Yi-Ping[1**] WU Jun-Xiang[1] LIANG Ge-Mei[2] GUO Yu-Yuan[2] YUAN Xiang-Qun[1***]

(1. Key Laboratory of Applied Entomology, College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; 2. State Key Laboratory of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract The effects of the separation of peritrophic membrane (PM) proteins from *Helicoverpa armigera* (Hübner) were compared using different treatment methods, different numbers of PM proteins and different electrophoretic conditions, in order to select the optimal technique. The results of SDS-PAGE show that, although freeze-drying is recommended for the separation of PM proteins, nearly equivalent results were achieved with and without freeze drying. Although one, three and five strips of PM protein could be completely separated by SDS-PAGE, five strips provide a more reliable representation of the population. There was no significant difference in the results obtained by SDS-PAGE using separation gel concentrations of 8%、10% and 12% and a stacking gel concentration of 5%. The optimum separation gel concentration was 12%. Treating PM with anhydrous trifluoromethanesulfonic acid before separation with NuPAGE resulted in approximately 30 types of PM protein, far exceeding the 16 - 20 types of proteins previously obtained from *H. armigera*. Furthermore, only a small amount of PM material was needed using this method. However, although this method was the most effective it is considerably more expensive than the alternatives.

Key words *Helicoverpa armigera*, peritrophic membrane protein, separation, electrophoretic techniques

昆虫围食膜是抵御随取食时摄入的病原微生物等不利因子入侵的天然保护性屏障,围食膜主要由蛋白质和几丁质组成,蛋白质是围食膜的主要成分,约占围食膜的 35% ~55%,其中糖蛋白能

* 资助项目:国家自然科学基金(No. 31071693,31272345);北农林科技大学博士科研启动基金(No. Z111021305)。

** E-mail: liyiping@nwsuaf.edu.cn

*** 通讯作者 E-mail: yuanxq@nwsuaf.edu.cn

收稿日期:2013-02-06,接受日期:2013-05-16

增加围食膜的致密性、坚韧性及半渗透性,蛋白多糖形成围食膜其余部分,它的多聚糖侧链形成高度伸展的缠绕结构(Tellam *et al.* ,1999;相静波等,2004)。蛋白质对于维持围食膜的致密结构至关重要,对围食膜蛋白的破坏可能会对昆虫的正常生长发育造成影响,甚至会导致低龄幼虫的死亡(Peng *et al.* ,1999)。关于围食膜蛋白的研究比较少,Tellam 等(1999)根据围食膜蛋白结合紧密程度将其分为 4 类,已鉴定的围食膜蛋白多是属于 3 类的围食膜因子,大部分蛋白结构和功能还不清楚。目前研究围食膜蛋白基本方法都是采用单向 SDS-PAGE 或双向电泳技术获得的,结果表明围食膜蛋白质种类较多,Ⅰ型围食膜中约 20 ~ 40 种,Ⅱ型围食膜中约 40 种(Lehane *et al.* ,1996;Tellam *et al.* ,1999)。由于围食膜的处理方法和 SDS-PAGE 的分离胶浓度不同,所获得的围食膜蛋白质种类也有差异。李帅等(2008)将华北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblita* Faldermann 围食膜蛋白质的种类与鳞翅目粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* (Hübner)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner)、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner)、粘虫 *Mythimna separata* (Walker) 4 种昆虫围食膜比较,其围食膜处理方法是取冻存于 -20℃ 的围食膜,加入上样缓冲液,其中分离胶 8%,浓缩胶 5%,没有说明处理围食膜的量,但他在研究增效蛋白处理华北大黑鳃金龟及 4 种鳞翅目昆虫围食膜蛋白的对比分析中提出是冻存的围食膜 3 条。张严峻等(2000)研究棉铃虫围食膜蛋白种类时采用冷冻干燥的围食膜 0.02 g,加入样品溶解液,其中分离胶为 10%,浓缩胶 5%。陈涛等(2008)研究棉铃虫、粘虫和甜菜夜蛾围食膜时是取 5 条冻存的围食膜,分离胶为 8% 和 12% 两种,浓缩胶均为 5%。李绪友等(2007)在 1.9 g 冷冻的甜菜夜蛾围食膜中加 1% 荧光增白剂 FB28 2.5 mL 来离解围食膜蛋白,将所得的上清透析脱去 FB28,以此获得甜菜夜蛾围食膜蛋白来制备围食膜蛋白。Campbell 等(2008)报道利用无水三氟利克酸(anhydrous trifluoromethanesulfonic acid,TFMS)可以溶解包括几丁质在内的全部棉铃虫围食膜组分,获得了几乎所有的围食膜蛋白。即使同种昆虫处理方法不同,获得的蛋白种类也不同,如张严峻等(2000)和 Campbell 等(2008)分别在棉铃虫围食膜中发现了 16 和 41 种蛋白。其次围食膜取材很不容易,而且要深入研究围食膜蛋白,需要饲养大量昆虫才能获得,收集材料的工作量很大,给研究带来很大麻烦。因此,选择取材量少,分离效果好,具有重复性的围食膜蛋白分离技术尤为重要,它将为深层次研究昆虫围食膜蛋白的功能和结构奠定良好的基础。棉铃虫是一种世界性分布的重要农业害虫,棉铃虫对 Bt 的抗性问题不容忽视(魏纪珍等,2012;张金平和张钟宁,2012),围食膜蛋白在抵御 Bt 抗性中具有一定的作用。鉴于此,以棉铃虫围食膜为材料,比较不同的围食膜处理方法,不同的围食膜数量,在不同的浓缩胶和分离胶浓度下的 SDS-PAGE 电泳分离效果,同时运用 Campbell 等(2008)报道利用无水三氟利克酸(TMFS)处理围食膜,NuPAGE 电泳分离,对比其分离效果,最终筛选出最佳的围食膜蛋白分离技术。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与饲养条件

棉铃虫品系(96S):于 1996 年采自河南省新乡棉田,室内用人工饲料饲养至今,从未接触任何杀虫剂。饲养条件:在温度(27 ± 2)℃,相对湿度 75% ± 10%,光周期 14L∶10D 条件下饲养。幼虫放在指形管中人工饲料饲养,饲料配方参照梁革梅等(1999)方法,成虫在产卵笼中用 10% 蜂蜜水饲养。上述棉铃虫品系来自于中国农业科学院植物保护研究所棉花害虫组。

1.2 主要试剂

丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺为 Merk 产品;三羟甲基氨基甲烷(Tris),十二烷基硫酸钠(SDS),甘氨酸(Glycine)为 Amersco 公司产品;考马斯亮蓝(Coomassie Brilliant Blue)R250 和 G250,Sigma 公司产品;β-巯基乙醇为 Amersham 公司;蛋白标准 Marker 为 Ferments 公司;2 × Loading Buffer,Ferments 公司;2D Clean-Up Kit,GE Biosciences 公司;GlycoPrfile™ IV,Chemical Deglycosylation Kit,NuPAGE LDS (lithium dodecylsulphate) sample buffer, NuPAGE Reduced Agent(10 ×),NuPAGE MOPS Running Buffer(20 ×),NuPAGE 4% ~12% Bis-Tris Gel,1 mm_ 10well,NuPAGE Antioxidant 均为美国 Invitrogen 公司。其他试剂为国产分析纯。

1.3 主要仪器

控温摇床 D250,美国 NBS 公司;凝胶成像仪

系统 Eagle Eye System,美国 Stragene 公司; 5417R 冷冻离心机,德国艾本德(Eppendorf Corporation)公司; SDS-PAGE 垂直电泳槽,美国伯乐公司;电泳仪 DYY-6C,北京六一仪器厂;冷冻干燥机(FD5508),美国 SIM 公司;准微量天平(AE-240S),美国 Mettler-Toledo 公司;NuPAGE 电泳槽,美国 Stragene 公司;超低温冰箱,Therm 公司。

1.4　棉铃虫围食膜的收集

取健康的棉铃虫 5 龄幼虫,置于冰上 10 min,剖取围食膜,用冷却的 0.7% NaCl 生理盐水冲洗去掉里面的食物,在滤纸上快速吸干多余液体,一部分是每 1 条放入 1 个 EP 管中,将 EP 管立即放入液氮中快速冷却,置 -80℃ 冰箱保存备用。另一部分也是每 1 条放入 1 个 EP 管中,液氮中快速冷却,冷冻干燥 48 h 后,置 -80℃ 冰箱保存备用。

1.5　棉铃虫围食膜蛋白不同处理下的 SDS-PAGE 电泳分离比较

样品处理:将 1、3、5 条冷冻干燥的围食膜与非冷冻干燥的 1、3、5 条围食膜分别放在一个离心管中,共 6 个处理,每个离心管中各加入 SDS-PAGE 上样缓冲液(2 × Loading Buffer)15 μL 和去离子水 15 μL,每管反应体系为 30 μL,混匀后 100℃ 煮沸 5 min,再于 12 000 r/min、4℃ 下离心 15 min,取上清液,准备上样。该处理可满足 2 块胶上样量。

将上述处理好的样品在浓缩胶均为 5%,分离胶为 8%、10% 和 12% 不同浓度下进行 SDS-PAGE 分离比较。每个浓度做两块胶,一块考染,一块银染。每孔上样 10 μL,加蛋白 Mark,进行 SDS-PAGE 电泳,先在 80 V 恒压下进行浓缩,当溴酚蓝到达分离胶位置时,电压升至 120 ~ 180 V,当溴酚蓝移动接近分离胶的底部时,结束电泳。取出胶块,染色,拍照。

1.6　棉铃虫围食膜蛋白的 TMFS 处理与 NuPAGE 电泳分离

样品处理:用 GlycoPrfile™ IV, Chemical Deglycosylation Kit(美国 Invitrogen 公司)试剂盒进行,具体为:(1)称取冷冻干燥的棉铃虫围食膜样品 1 mg 放到有盖的反应瓶中。(2)加入在 2 ~ 8℃ 下预先冷却的无水三氟利克酸(TFMS)140 μL 及苯甲醚 15 μL,快速盖上瓶盖,在冰浴上孵育反应 3 h,同时不断在摇床上缓慢摇动。(3)沿着样品反应瓶内壁加入 4 μL 0.2% 的溴酚蓝溶液做为指示剂,并摇匀,溶液的颜色将变为红色。(4)快速一滴一滴地在样品反应瓶中加入预冷的 60% 氮苯溶液,直到溶液的颜色变成淡紫色或者蓝色,在加的过程中注意摇动和冷却样品反应瓶。一般情况下,将约 300 μL 的 60% 氮苯溶液加到用 150 μL 的 TFMS 处理后的样品溶液中时,围食膜蛋白将完全分解,最后总体积不超过 500 μL,多次重复实验实际获得体积为 400 μL。上述需在通风厨中进行,反应在 2 ~ 8℃ 或冰浴上操作。

样品纯化:用 2D Clean-Up Kit(GE Biosciences 公司)试剂盒进行,将上述分离获得的围食膜蛋白溶液分成 2 份,每份 200 μL,分别加到 2 mL 离心管中,按操作要求不断用丙酮沉淀,即可获得纯化的围食膜蛋白。

在上述得到的围食膜沉淀蛋白中分别加入 NuPAGE LDS (lithium dodecylsulphate) sample buffer 和含有的 NuPAGE Reduced Agent 上样缓冲液后,在 95℃ 下加热 10 min 分钟,使其再溶解。将预制梯度胶(NuPAGE 4% ~ 12% Bis-Tris Gel)放在 NuPAGE 专用电泳槽中,槽中加入含有 NuPAGE Antioxidant 的电泳缓冲液(NuPAGE MOPS Running Buffer),接通电泳仪,在持续 200 V 电压下进行 1D-PAGE 电泳,大约 50 min 后即可将围食膜蛋白分离。取出胶块,考染,拍照。

2　结果与分析

2.1　棉铃虫围食膜蛋白不同处理下的 SDS-PAGE 电泳分离比较

2.1.1　浓缩胶 5% 分离胶 8% 时的分离结果　1、3、5 条冷冻干燥的围食膜与非冷冻干燥的 1、3、5 条围食膜共 6 个处理,在浓缩胶 5%,分离胶 8% 时的 SDS-PAGE 电泳分离结果见图 1,可以看出无论是考染图 1(A)还是银染图 1(B),非冷冻干燥的 1、2、3 泳道和冷冻干燥的 4、5、6 泳道分离效果基本一致,而且 1、3、5 条(泳道 1、2、3 或 4、5、6)围食膜数量间的差异不大,都能将蛋白分离开来,并且银染比考染效果更明显,能够分离出大约 16 种围食膜蛋白。对大于 34 ku 的蛋白分离效果好。

2.1.2　浓缩胶 5% 分离胶 10% 时的分离结果　1、3、5 条冷冻干燥的围食膜与非冷冻干燥的 1、3、5 条围食膜共 6 个处理,在浓缩胶 5%,分离胶 10% 时的 SDS-PAGE 电泳分离结果见图 2,可以看出无

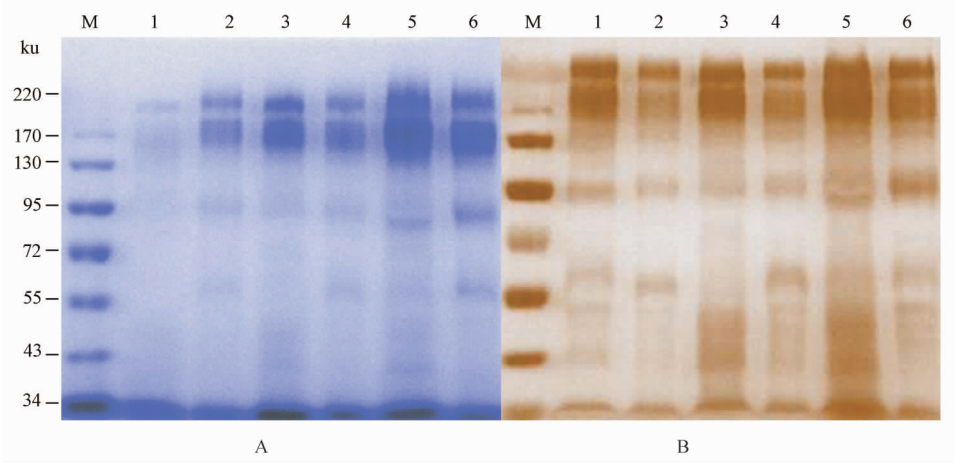

图 1 棉铃虫围食膜蛋白质 SDS-PAGE 电泳图(8%分离胶)

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the peritrophic membrane proteins of *Helicoverpa armigera* (8% resolving gel)

A: 考染;B:银染;M: 标准蛋白; 1,3, 5: 非冷冻干燥的 1, 3, 5 条围食膜;2, 4, 6: 冷冻干燥的 1, 3, 5 条围食膜。A: dyed with silver; B:dyed with coomassie brilliant blue;M: protein marker; 1, 3, 5: the peritrophic membrane from 1, 3 and 5 larvae of *H. armigera*, respectively, that was not dehydrated by lyophilisation; 2, 4, 6: 1, 3, 5 the peritrophic membrane from 1, 3 and 5 larvae of *H. armigera*, respectively, that was dehydrated by lyophilisation.

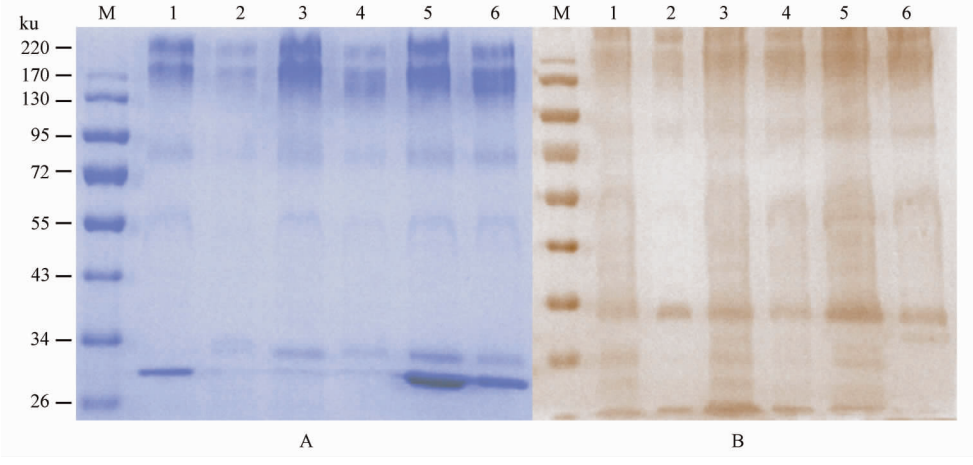

图 2 棉铃虫围食膜蛋白质 SDS-PAGE 电泳图(10%分离胶)

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the peritrophic membrane proteins of *Helicoverpa armigera* (10% resolving gel)

A: 考染;B:银染;M: 标准蛋白; 1, 3, 5: 非冷冻干燥的 1, 3, 5 条围食膜;2、4、6: 冷冻干燥的 1, 3, 5 条围食膜。A: dyed with silver; B:dyed with coomassie brilliant blue;M: protein marker; 1, 3, 5: the peritrophic membrane from 1, 3 and 5 larvae of *H. armigera*, respectively, that was not dehydrated by lyophilisation; 2, 4, 6: the peritrophic membrane from 1,3 and 5 larvae of *H. armigera*, respectively, that was dehydrated by lyophilisation.

论是考染图 2(A)还是银染图 2(B),非冷冻干燥的 1、2、3 泳道和冷冻干燥后的 4、5、6 泳道分离效果基本一致,而且 1、3、5 条(泳道 1、2、3 或 4、5、6)围食膜数量间的差异不大,都能将蛋白分离开来,并且银染比考染效果更明显,能够分离出大约 18 种围食膜蛋白。对大于 26 ku 的蛋白分离效果好。

2.1.3 浓缩胶 5%分离胶 12%时的分离结果 1、3、5 条冷冻干燥的围食膜与非冷冻干燥的 1、3、5 条围食膜共 6 个处理,在浓缩胶 5%,分离胶 12%时的 SDS-PAGE 电泳分离结果见图 3,可以看出无

论是考染图 3(A)还是银染图 3(B),可以看出非冷冻干燥的 1、2、3 泳道和冷冻干燥后的 4、5、6 泳道分离效果基本一致,而且 1、3、5 条(泳道 1、2、3 或 4、5、6)围食膜数量间的差异不大,都能将蛋白分离开来,并且银染比考染效果更明显,能够分离出大约 20 种围食膜蛋白。对大于 17 ku 到 220 ku 之间的蛋白分离效果都好,也是胶的特性决定的。并且对所有蛋白包括大分子量 220 ku 的和小分子量 10 ku 都能分离出来。

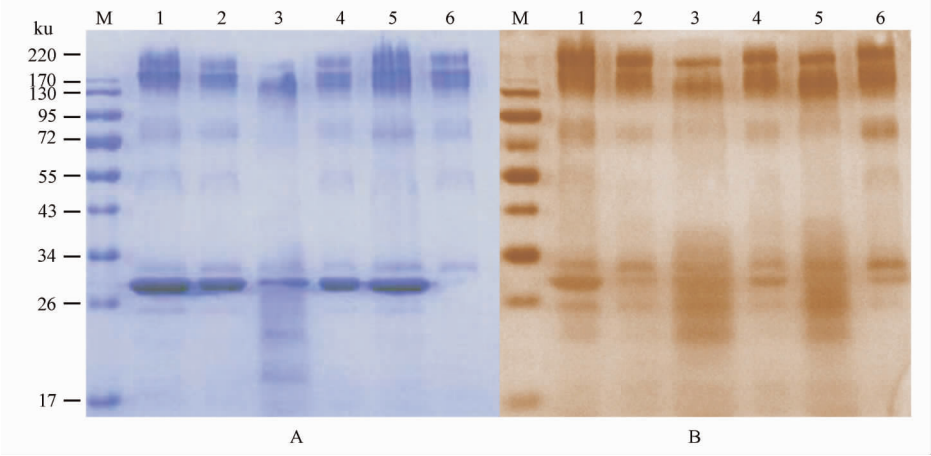

图 3　棉铃虫围食膜蛋白质 SDS-PAGE 电泳图(12%分离胶)

Fig. 3　SDS-PAGE analysis of the peritrophic membrane proteins of *Helicoverpa armigera* (12% resolving gel)

A: 考染;B:银染;M: 标准蛋白; 1, 3, 5: 未冷冻干燥的 1, 3, 5 条围食膜;2, 4, 6: 冷冻干燥的 1, 3, 5 条围食膜。A: dyed with silver; B:dyed with coomassie brilliant blue;M: protein marker; 1, 3, 5: the peritrophic membrane from 1, 3 and 5 larvae of *H. armigera*, respectively, that was not dehydrated by lyophilisation; 2, 4, 6: the peritrophic membrane from 1, 3 and 5 larvae of *H. armigera*, respectively, that was dehydrated by lyophilisation.

2.2　棉铃虫围食膜蛋白的 TMFS 处理与 NuPAGE 电泳分离

TFMS 先处理围食膜后分离蛋白,2D Clean-Up Kit 试剂盒纯化蛋白,用 NuPAGE 4% ~12% Bis-Tris Gel 的预制梯度胶及 NuPAGE 电泳槽进行 NuPAGE 电泳分离,结果如图 4,重复三次(泳道 1、2、3),可以看出分离效果即使考染也很清晰,可以分离出大约 30 种围食膜蛋白。

3　讨论

本研究以棉铃虫围食膜为材料,通过比较不同的围食膜处理方法表明:冷冻干燥与非冷冻干燥处理后进行 SDS 电泳分离效果基本相同,建议直接剖取新鲜的或 -80℃保存的围食膜立即进行 SDS 电泳比较好,但如需要贮存一段时间或需要大量围食膜进行 SDS 电泳,建议使用冷冻干燥后处理较好,如张严峻等(2000)、朱蓉等(2003)、张小霞等(2005)、陈涛等(2008)、李帅(2008)等均是使用冷冻干燥后的围食膜进行 SDS 电泳的。

围食膜取材很不容易,选择取材量越少的方法越受欢迎。研究通过比较棉铃虫 1、3、5 条围食膜的 SDS 电泳表明,他们都能将围食膜蛋白分离,而且分离效果基本一致,也证明 1 条围食膜的就可以到达分离效果,大大的降低了取材工作量。但如果从群体代表性方面考虑,建议 5 条围食膜最合适,工作量适中,结果具有可靠性和代表性。陈涛等(2008)研究棉铃虫、粘虫和甜菜夜蛾围食膜时是取 5 条冻存的围食膜;李帅等(2008)处理华北大黑鳃金龟及 4 种鳞翅目昆虫围食膜蛋白的对比分析中提出是冻存的围食膜 3 条;周洪旭(2009)取冻存于 -70℃的华北大黑鳃金龟、暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela* Motschulsky、粉纹夜蛾、棉铃虫和粘虫的围食膜各 1 条;朱蓉等(2003)与李绪友等(2007)研究甜菜夜蛾围食膜 SDS-PAGE 分析蛋白质种类均取出冻存的围食膜 10 条。本研究结果与上述报道基本一致,只是和张严峻等(2000)研究棉铃虫围食膜蛋白种类时采用冷冻干燥的围食膜 0.02 g 有些出入。

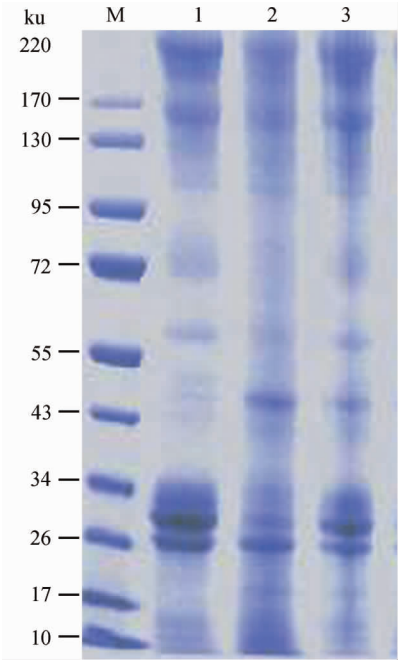

图 4 棉铃虫围食膜蛋白质 NuPAGE 电泳图(4% ~12% 梯度分离胶)

Fig. 4 NuPAGE analysis of the peritrophic membrane proteins of *Helicoverpa armigera* (4% –12% gradient resolving gel)

M: 标准蛋白; 1, 2, 3:围食膜蛋白。

M: protein marker; 1, 2, 3: peritrophic membrane proteins.

在浓缩胶为 5%、分离胶浓度不同下,对棉铃虫围食膜蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离效果表明,分离胶分别为 8%、10% 和 12% 时的分离效果差异不大。张严峻等(2000)研究棉铃虫围食膜蛋白种类的分离胶为 10%,发现不同分子量的蛋白质种类很多,分离出比较清晰的 16 条带,蛋白质分子量一般在 97.4 ku 以下,很多蛋白质的分子量很接近。张小霞(2005)研究棉铃虫围食膜蛋白质的种类,分离胶为 12%,发现围食膜蛋白质种类较多,至少有 14 种蛋白质,并且小分子量的蛋白质含量较高,分子量一般在 97 ku 以下,同样许多蛋白质的分子量很接近。朱蓉等(2003)与李绪友等(2007)研究甜菜夜蛾围食膜蛋白质种类,分离胶均为 12%,显示蛋白质种类很多,至少有 17 种蛋白质,分子量多在 97.4 ku 以下,而且多数比较接近。李帅(2008)将华北大黑鳃金龟围食膜蛋白质的种类与鳞翅目粉纹夜蛾、棉铃虫、甜菜夜蛾、粘虫 4 种昆虫围食膜比较时,分离胶 8%,发现鳞翅目 4 种昆虫围食膜主要蛋白条带在 19 条以内,而华北大黑鳃金龟有 28 条比较清晰。周洪旭(2009)用 8% 分离胶分离多种昆虫围食膜蛋白发现华北大黑鳃金龟至少有 28 条带,暗黑鳃金龟比较清楚的带有 15 条,而鳞翅目昆虫粉纹夜蛾、甜菜夜蛾、棉铃虫和粘虫蛋白分别有 19、17、16 和 9 条,其中棉铃虫比较清晰的 16 条带的蛋白分子量多在 9 7 ku 以下,以 46.75、45.31 和 41.44 ku 3 条带最亮,蛋白含量最高。本研究的结果与上述文献中报道的基本一致,但根据张严峻等(2000)和周洪旭(2009)的结果表明棉铃虫围食膜蛋白中小分子量的蛋白含量较多,结合本研究的结果,认为对棉铃虫围食膜蛋白分离胶为 12% 时分离效果较好。并且陈涛等(2008)研究棉铃虫、粘虫和甜菜夜蛾围食膜蛋白时也曾用 12% 的分离胶,取得了理想的分离效果。

由于围食膜中大部分蛋白质被不同程度糖基化,多糖在一些蛋白中含量高达 50%(Shi *et al.*, 2004),因此,围食膜蛋白主要以蛋白质、糖蛋白以及粘蛋白(insect intestinal mucin, IIM)等形式存在。Tellam 等(1999)将围食膜蛋白质根据其抽提的难易程度分为 4 类,分别为用生理盐水即可洗脱的结合较为松驰的蛋白;用十二烷基硫酸钠等柔和的表面活性剂破坏离子间的相互作用即可提取的蛋白;只能用尿素等强变性剂才能将其从围食膜中解离出的蛋白;用任何方法都不能将其从围食膜中解离出的,可能与其他蛋白质或几丁质共价结合的蛋白质。目前分离的主要是可溶于强变性剂的蛋白称为围食膜因子,所有的围食膜蛋白要彻底被分离,就必须寻找和探索新的分离方法。

Campbell 等(2008)报道无水三氟利克酸(TFMS)可以溶解全部围食膜组分,包括几丁质在内,可将蛋白从几丁质中解离,获得几乎所有的围食膜蛋白。该方法运用 GlycoPrfile™ IV 化学去糖基化试剂盒是优先选择的分离糖蛋白样品试剂盒,里面的主要试剂 TMFS 对去糖基化是非常有效的,它可以保护核心蛋白,TFMS 水解作用很少导致蛋白降解。TFMS 介导的去糖基化可以有效地移除多种多样的寡聚糖修饰。试剂盒里的无水苯甲醚是一种良好的蛋白净化剂,它可以促进蛋白的分离,保护氨基酸的位点和侧链,确保获得高产量的蛋白。通过 TFMS 反应,可提供既方便又多样

的通过去糖基化移除多糖,而且去糖基化的蛋白也可以用适当的操作回收,例如透析和凝胶筛选等。另外,该方法是用 NuPAGE 4% ~12% Bis-Tris Gel 的预制梯度胶,扩大了蛋白分离的范围,可以很好地将大分子量及小分子量蛋白都能分开,是一种有效的蛋白质提取与分离技术。本研究运用此方法对棉铃虫围食膜蛋白进行分离,获得了与 Campbell 等(2008)基本一致的分离效果,分离出的围食膜蛋白大约 30 多种,远远超过上面常规的研究报道的 16 ~20 种,获得了良好的分离效果,为后面进一步研究围食膜蛋白奠定了基础。虽然本研究没有完全分离出和 Campbell 等(2008)一样的 41 种,原因可能是棉铃虫的不同地理分化造成的,因为我们所有方法、仪器和试剂全部与 Campbell 等(2008)一致。再者,该方法处理的围食膜为冷冻干燥后的 1 mg 样品,大约也就是 15 条围食膜,需要的材料不是很多,不必把时间耗费在大批量饲养虫上。其次,该方法虽然分离围食膜蛋白非常有效,但费用相当高,所有仪器和试剂包括预制胶均采用美国 Invitrogen 公司产品,还有纯化蛋白用的 2D Clean-Up Kit 试剂盒也是用 GE Biosciences 公司产品,所以,如果研究经费有限,可以慎重考虑运用该方法。

参考文献(References)

Campbell PM, Cao AT, Hines ER, East PD, Gordon KH, 2008. Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the gut of the caterpillar, *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38:950 – 958.

Lehane MJ, Allingham PG, Weglicki P, 1996. Composition of the peritrophic matrix of the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. *Cell. Tissue. Res.*, 283:375 – 384.

Peng JX, Zhong J, Granados RR, 1999. A baculovirus enhancin alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae. *J. Insect Physiol.*, 45(2):159 – 166.

Shi X, Chamankhah M, Visal-Shah S, Hemmingsen SM, Erlandson M, Braun L, Alting-Mees M, Khachatourians GG, O'grady M, Hegedus DD, 2004. Modeling the structure of the type I peritrophic matrix: characterization of a *Mamestra configurata* intestinal mucin and a novel peritrophin containing 19 chitin binding domains. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(10):1101 – 1115.

Tellam RL, Wijffels G, Willadsen P, 1999. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29(2):87 – 101.

陈涛, 王俊平, 李淑文, 周洪旭, 李国勋, 2008. 荧光增白剂和增效蛋白对粘虫核型多角体病毒的增效作用. 华北农学报, 23(4):23 – 27.

李帅, 李淑文, 李长友, 周洪旭, 李国勋, 2008. 鞘翅目害虫——华北大黑鳃金龟围食膜结构的初步研究. 华北农学报, 23 (4):55 – 59.

李绪友, 彭建新, 洪华珠, 2007. 昆虫围食膜蛋白抗体对重组 AcMNPV 感染性的影响. 植物保护学报, 34(2):223 – 224.

梁革梅, 谭维嘉, 郭予元, 1999. 人工饲养棉铃虫技术的改进. 植物保护, 25(2):15 – 17.

魏纪珍, 梁革梅, 高希武, 高珍, 张万娜, 郭予元, 2012. Cry2Ab 及 Cry1Ac 杀虫蛋白对棉铃虫中肠蛋白酶活性的影响. 应用昆虫学报, 49(4) :839 – 846.

相静波, 刘惠霞, 吴文君, 2004. 昆虫围食膜的研究进展. 昆虫知识, 41 (2):116 – 122.

张金平, 张钟宁, 2012. 棉铃虫性信息物质研究进展. 应用昆虫学报, 49(1):259 – 267.

张小霞, 2005. ClanGV 的分子生物学特性和棉铃虫 PM 的研究. 博士学位论文. 武汉:中国科学院武汉病毒研究所.

张严峻, 谭军, 林玉清, 2000. 棉铃虫围食膜的结构和组成. 浙江农业学报, 12(3):140 – 143.

周洪旭, 2009. 两种鳃金龟围食膜及其结构蛋白的分离鉴定. 博士学位论文. 泰安:山东农业大学.

朱蓉, 彭建新, 洪华珠, 2003. 光增白剂对甜菜夜蛾围食膜结构的作用与影响. 昆虫学报, 46(4):424 – 428.