

- 140, 1972.
- [7] Nilsson, O.: *J. Lipid Res.*, 23, 327, 1982.
- [8] Momoi, T. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 441, 488, 1976.
- [9] Ariga, T. et al.: *J. Biol. Chem.*, 257(5), 2230, 1982.
- [10] Folch, J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 226, 497, 1957.
- [11] Ledeen, R. W. et al.: *J. Neurochem.*, 121, 829, 1973.

- [12] Ledeen, R. W. et al.: *Methods in Enzymology*, 83, 139, 1982.
- [13] Svennerholm, L.: *Biochim. Biophys. Acta*, 24, 604, 1957.
- [14] Vaskovsky, VE, et al.: *J. Lipid Res.*, 9, 396, 1968.
- [15] Aminoff, D.: *Biochem. J.*, 81, 384, 1961.
- [16] Kanfer, JN.: *Methods in Enzymol.*, 19, 14, 660.
- [本文于 1984 年 9 月 15 日收到]

不同地理株白纹伊蚊同工酶和可溶性蛋白的比较研究

李成文 邵军石 时华富 张京生 陆宝麟

(军事医学科学院微生物流行病学研究所)

采用生化技术进行蚊虫分类学和亲缘关系的研究,国外已有不少报道。Robert^[1]等综述了昆虫同工酶及其意义; McDonald 等^[2]和我国的廖建吾^[3]都分别报道了白纹伊蚊的酯酶及可溶性蛋白的电泳图谱,但目前尚未见到对不同地理株的同种蚊虫的生化分析结果。

我们采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和等电点聚焦电泳(IFE),先后对三属六种十二株伊蚊、库蚊及按蚊作了酯酶、 α -磷酸甘油脱氢酶及蛋白的生化分析。现将结果报告如下。

一、材料和方法

1. 实验材料 采用本所饲养的白纹伊蚊 [*Aedes albopictus* (Skuse)] 广州株、南宁株、上海株、海南株、云南株及宜兴株;埃及伊蚊 [*Aedes aegypti* (Linnaeus)] Bora-Bora 株和海南株;黄斑伊蚊 (*Aedes flavopictus* Yamada)。淡色库蚊 (*Culex pipiens pallens* Coquillett); 三带喙库蚊 (*Culex tritaeniorhynchus* Giles) 及中华按蚊 (*Anopheles Sinensis* Wiedemann)。

2. 同工酶和可溶性蛋白的分析方法

(1) 材料处理 取羽化三日龄虫体于 0℃ 冰箱低温麻醉一小时左右,数 50 只雌或雄蚊分别放于匀浆器内,加入 0.5ml 蒸馏水,在冰浴上匀浆,4℃,10,000rpm/ 分离心 10 分钟,取上清放 2℃ 冰箱备用(3 天之内)。

(2) 蛋白浓度测定 分别测出样品的 OD_{280nm} 和 OD_{260nm} 值后,根据 Warbury^[4]公式计算蛋白浓度

$$(\text{mg/ml}) = 1.45\text{OD}_{280} - 0.74\text{OD}_{260}$$

(3) 等电点聚焦电泳^[5] T = 8%, pH3.5—10.2% 两性载体,每根胶柱 3—4mA,电泳 3—4 小时。以 0.01% 考马斯亮蓝 G-250 快速染色^[6],或酯酶同工酶染色。

(4) PAGE 技术 不连续系统, T = 7%, 每根胶柱 3mA, 电泳 50 分钟左右,其它条件同(3)。

(5) 酯酶同工酶 (EST) 染色法 为本组改进方法。称重氮蓝固蓝 RR140mg 溶于 100ml 0.1M pH 6.5 P.B. 中,过滤后新鲜使用。取上述染液 100ml 加入 1% α -乙酸萘酯 (1 克溶于 70% 乙醇至 100ml) 2.5ml。将电泳后胶条放入上述溶液中,水浴 37℃ 保温 50 分钟,用水漂洗数次,固定于乙酸:甲醇:水 = 1:5:5(V/V) 的溶液中 24 小时,然后放 7% 乙醇中保存。

(6) α -甘油磷酸脱氢酶 (α -GPDH) 同工酶染色^[7] 取 100ml 0.1M pH8.5 Tris-HCl, 内含 0.1M α -甘油磷酸钠 3.15 克, 10mg 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, 10mg 硝基蓝四氮唑, 2mg 酚嗪甲酯硫酸盐 (N-MPM), 0.001MEDTA-Na50 μ l, 混合后新鲜使用。染色方法同(5)。

(7) 同工酶带及蛋白带扫描均采用 CS-90

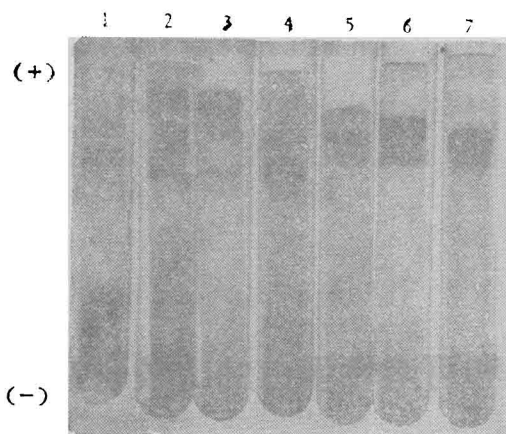


图1 不同种蚊虫匀浆酯酶的聚焦电泳分析

1. 中华按蚊(♀), 2. 三带喙库蚊(♀), 3. 淡色库蚊(♀), 4. 黄斑伊蚊(♂)
5. 埃及伊蚊, 6—7. 分别为白纹伊蚊的云南、宜兴及广州株(♂)

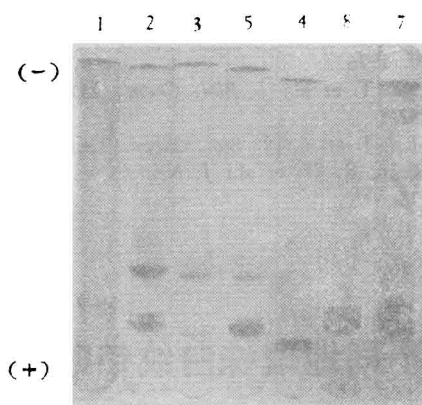


图2 不同种蚊虫匀浆酯酶的 PAGE 分析

岛津高速薄层扫描仪。

二、结 果

通过对六株白纹伊蚊、两株埃及伊蚊、两种库蚊及中华按蚊的同工酶和可溶性蛋白的分析,认为采用电泳技术,特别是使用分辨力较高的聚焦电泳,不仅在鉴定蚊虫的种属间具有显著地分类意义,而且对于同一种不同地理株白纹伊蚊的分类与亲缘关系的鉴别,也提供了重要依据。其详细结果如下:

1. 对中华按蚊、三带喙库蚊及淡色库蚊、黄斑伊蚊、埃及伊蚊和白纹伊蚊的云南、宜兴及广州三株的 EST 分析,结果表明不同种属间的酶谱差别较大,具有重要的分类意义。这同国内外文献报道完全一致(见图 1-2)。

2. 用 PAGE 对六个不同地理株的白纹伊蚊的 EST 分析,其结果证明,在不同地理株间 EST 谱带亦有区别,且上海、云南两株的酶谱同宜兴、广州、南宁与海南四株的酶谱差别显著。广州、南宁和海南三株间酶谱十分近似。六株白纹伊蚊的 EST 谱带都有共同的酶活力高、浓度大的向正极迁移最快的酶带,以及位于负极端酶活力低的酶带,此现象反映出株间的亲缘关系(见图 3)。

3. 六株白纹伊蚊 EST 的聚焦电泳分析酶

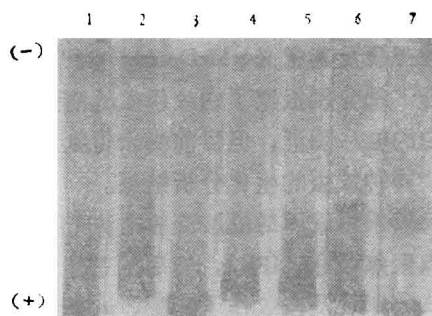


图3 不同地理株白纹伊蚊酯酶的 PAGE 分析

1—6 分别为白纹伊蚊的宜兴、广州、海南、云南、广西及上海株,7 为埃及伊蚊的海南株

谱既反映了种内的亲缘关系,也显示出株间的异同。六株中的广州、海南和南宁三株间的酶谱极相似,在 pI 4.3—4.8 间有一条宽酶带,在 pI 5.5 左右有一窄酶带,这三株的酶谱同宜兴、上海和云南三株的酶谱有明显不同,而后三者酶谱间亦有差异。从上述结果证实了不同地理株间的酯酶同工酶不仅酶浓度、活力及 pI 值都有较大区别,在亲缘关较近的地理间则十分近似。结果见图 4。

4. 实验中用 IFE 和 PAGE 技术比较分析了不同地理株白纹伊蚊匀浆的可溶性蛋白,除 PAGE 分析中的宜兴和南宁两株的蛋白带在深浅、宽窄与位置,和其它株有一定的差别外,其它株间的蛋白带两种电泳结果则差别较小,在

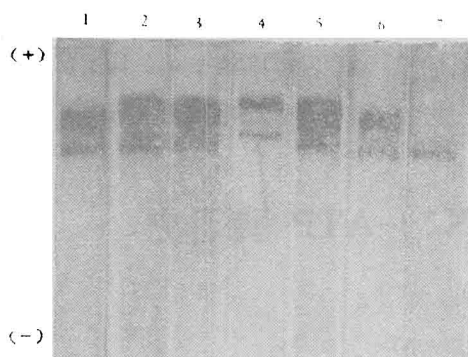


图4 不同地理株白纹伊蚊(♀)酯酶的 IFE 分析
图4-5中,1-6分别为白纹伊蚊的宜兴、广州、海南、云南、广西和上海株,7为埃及伊蚊的海南株

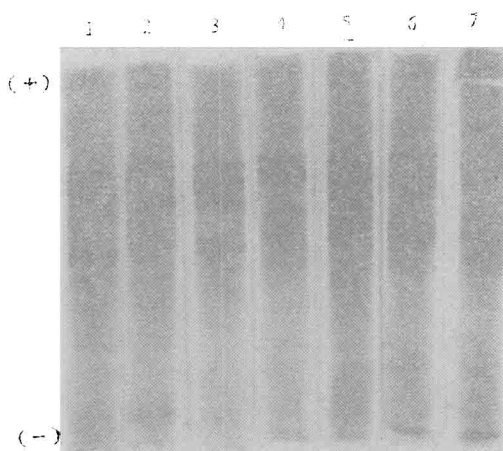


图5 不同地理株白纹伊蚊匀浆蛋白的 IFE 分析

1-6分别为白纹伊蚊的宜兴、广州、海南、云南、南宁和上海株(♀),7为埃及伊蚊的海南株(♀)

分类学上意义不大,见图5、6。

另外,用 PAGE 对上述七株蚊虫匀浆进行了 α -GPDH 的比较研究。仅上海和云南两株白纹伊蚊在靠负极端有两条较宽的酶带,其它株白纹伊蚊仅有一条靠负极的酶带。一株埃及伊蚊则有明显地三条酶带。结果说明此同工酶具有种间的分类价值。还用紫外吸收法测定了各株蚊虫匀浆的蛋白浓度,分析了紫外吸收光谱特征,发现各种蚊虫匀浆的蛋白浓度均远高于雄虫匀浆的蛋白浓度。各株白纹伊蚊匀浆的紫外吸收光谱都具有在 224nm 和 260nm 两个吸收峰的共同特征,而其它蚊种匀浆的紫外吸收光谱都不具有这一特征吸收峰。这些光谱特征也反映出种间的差别,以及种内的亲缘

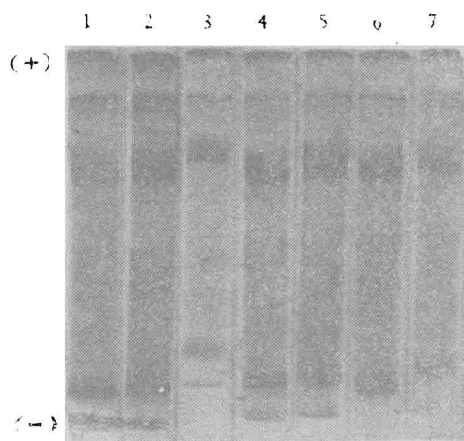


图6. 不同地理株白纹伊蚊匀浆蛋白的 PAGE 分析

关系。

三、讨 论

本研究中,除上述内容之外,对于不同地理株白纹伊蚊匀浆还观察了苹果酸脱氢酶^[8]、酸性磷酸酶及碱性磷酸酶^[9]的电泳图谱,其结果在不同地理株蚊虫间差异不大。

实验中还注意到,蚊虫的匀浆蛋白及酶活力高低,都易受变性因素的影响,特别是温度条件,所有操作最好都在低温条件下进行。所制备样品 0℃ 左右放置两天后同工酶活力有所降低,对分析样品都要同样条件,新鲜使用。

不同批次的蚊虫其同工酶酶谱,其活力高低与带的多少,略有不同,但基本一致。我们在分株分析的基础上,又一次饲养七株同时制样,同时分析,以减少各批次和操中产生的误差。

参 考 文 献

- [1] Robert, R. et al: *Annual Review of Entomology* **19**, 116—138, 1974.
- [2] McDonald, J. et al: *Mosquito News*, **32**, 1—5, 1972.
- [3] 缪建吾等:《昆虫学研究集刊》(第一集),1980年,第89—91页。
- [4] Warbury, O. et al: *Biochem. J.*, **303** (40), 1959.
- [5] 李成文等:《等电点聚焦电泳》,军事医学科学院五所科研工作年报,1982年。

- [6] 李成文等:《生物化学与生物物理进展》6, 71—73 页 1983 年
- [7] 阎一林:《中华按蚊种间亲缘种的生化差异》(内部资料(动物所研究生论文) 1982 年。
- [8] Andrew, C. et al: *Biochemical Genetics*, **18**, (11/

12) 1185, 1980.

- [9] Othmar, G.: *Methods in Enzymology*, **XXI** (22), 590, 1971.

[本文于 1984 年 6 月 16 日收到]

铊激活人红细胞膜 (Na^+-K^+)-ATP 酶研究

蒋 斌 孙 祺 薰

(中国科学院上海原子核研究所)

铊是 III 族元素,放射性药物铊 (^{201}Tl) 对心肌组织有一定亲和性^[1]。近十多年,日趋广泛地应用于临床心肌灌注显影,诊断心肌疾患,效果较好。但它由细胞转运而为细胞摄取、组织浓集的机理至今未被阐明^[2]。本工作是在研究完整细胞摄取 Tl^+ 规律、机理的基础上^[3],进一步探讨 Tl^+ 的细胞膜转运和 (Na^+-K^+)-ATP 酶 (Na 泵)之间的联系,用人红细胞膜为材料,比较研究 Tl^+ 和 K^+ 激活人红细胞膜 (Na^+-K^+)-ATP 酶的异同。

一、材料和方法

(Na^+-K^+)-ATP 酶是细胞膜上一横贯质膜的固有蛋白。我们用人红细胞膜作为粗制的 (Na^+-K^+)-ATP 酶。在适当条件下,用酶分解底物而产生的无机磷量 (Pi) 来衡量酶活性,比活性单位为 $\mu\text{molePi} \cdot \text{mgP}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$, 其中 mgP 是单位重量红细胞膜蛋白量。本实验用血取自同血型而无近期服药史,无烟酒嗜好的健康中年男女志愿献血者。每次三名早晨空腹抽血,肝素抗凝,等量混合,献血员要相对固定。

主要参照 Dodge, J. T. 的方法^[4],用低渗溶血,密度梯度差速离心法制备人红细胞膜。做法是先由 $\text{pH}7.4$ 等渗磷酸盐缓冲液多次悬洗离心,充分分离红细胞,然后用 $\text{pH}7.4$ 10mM Tris 缓冲液低渗涨破溶血,缓冲液和红细胞容积比为 $70:1$,搅拌 1—2 分钟。再用同一低渗液三次悬洗及 $10000-20000\text{g}$ $\text{RCF} \times 15$ 分离心(HITACHI20PR-52D 高速冷冻离心机),即

可制得匀一的乳白色的红细胞膜。全部操作温控在 -2°C 。经相差显微镜观察,人红细胞膜为匀一圆形或扁圆形透明而有皱纹的结构,不含完整红细胞和污染的白细胞、细菌等(图 1)。

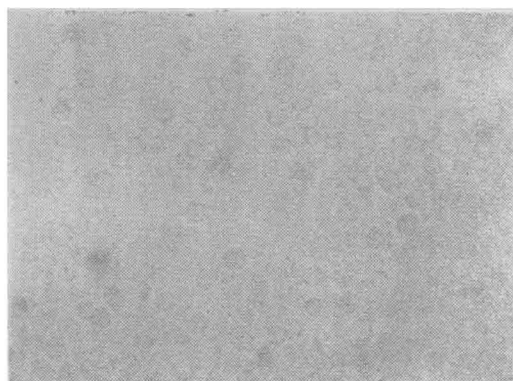


图 1 人红细胞膜
($\times 600$)

为了使测试结果准确可靠,凡包括有若干对比条件(如不同浓度的 K^+ 和 Tl^+) 的同一个实验使用同一次制得的人红细胞膜。

红细胞膜蛋白定量采用 Lowry, O. H. 法^[5]。在 $10-100\gamma$ 范围内,光密度和蛋白量线性关系良好。制得的人红细胞膜经碱溶液稀释 50 倍即为测蛋白样品,其蛋白浓度恰在此线性范围内。最后用低渗 Tris 液将人红细胞膜浓度调到 3mg 蛋白/ ml 。无机磷测定主要参照 Lagarus, L. H. 的方法^[6],用 ANSA 为钼蓝显色还原剂。本方法在 $2-20\gamma\text{Pi}$ 内,光密度和 Pi 量呈线性关系,本实验测样 Pi 量均在此范围内。此法测 Pi 灵