

双向凝胶电泳图谱用于常见尸食性 蝇类初孵幼虫的鉴别

李凯, 叶恭银*, 胡萃

(浙江大学应用昆虫学研究所 杭州 310029)

摘要: 双向凝胶电泳分析技术已在生物科学各领域被广泛应用, 蛋白质组作图的意义已经日益显现。通过对 4 种常见尸食性蝇类初孵幼虫蛋白质组双向凝胶电泳和图象分析, 发现各种类间双向凝胶电泳图谱差异显著, 并对相应的等电点和相对分子量进行聚类 and 判别分析, 结果表明, 建立合适的尸食性蝇类初孵幼虫的双向凝胶电泳图谱可用于鉴别形态学极易混淆的昆虫种类。

关键词: 蛋白质组; 双向凝胶电泳; 法医昆虫学; 尸食性蝇类; 种类鉴别

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2005)04-0576-06

Identification of early larvae of common carrion-breeding flies by two-dimensional gel electrophoresis finger map

LI Kai, YE Gong-Yin*, HU Cui (Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: With the application of two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) technology in biology science, the importance of constructing proteome map has been recognized. Protein maps of neonate larvae of four common carrion-breeding fly species were obtained using 2-DE in the range of pH 4-7. After silver stained detection of protein spots, we found that there were marked differences among these maps. Isoelectric points and molecular weight analysis indicated that 2-DE map could be used to identify neonate larvae of common carrion-breeding flies which are confused in morphology.

Key words: Proteom; two-dimensional gel electrophoresis; forensic entomology; carrion-breeding flies; species identification

法医昆虫学是研究并解决司法时间中有关昆虫学问题的一门科学。它主要利用尸体上昆虫的演替规律与蝇类的生长发育为侦察提供尸体的死亡时间等事实真相。昆虫种类的快速鉴定是利用尸食性昆虫进行法医学案件分析关键的第一步(胡萃, 2000)。用传统的形态学方法鉴定尸体上及其附近发现的蝇类幼虫常较困难。其原因之一是昆虫种类繁多, 仅有少数专家能对其熟悉的科或目的种类进行鉴定; 原因之二是部分蝇类种间形态差异微小, 尤其是幼期时极难鉴别。然而, 尸食性蝇类是死亡调查中最常见的昆虫证据, 且自 1985 年以来生物检材的分子分析技术已成为法医调查中个体鉴定的强有力工具, 在法医昆虫学领域, 探索以核酸分析为基础、迅

速可靠地鉴定各个发育阶段尸食性昆虫种类的方法已成为近年来研究的热点之一(Byrd and Castner, 2001)。

近年来蛋白质组学在以医学为主的生命科学领域应用较多, 在昆虫学方面也已逐渐开始有不少的研究。先后用于昆虫血淋巴(Farkas *et al.*, 1999)、飞行肌(Vigoreaux, 2001)、中枢神经(Baggerman *et al.*, 2002)、体壁表皮(Andersen, 2000; Missios *et al.*, 2000)以及媒介昆虫唾液腺与病原体(Haddow *et al.*, 2002; Valenzuela, 2002)的蛋白质组分析, 显示了良好的前景。在蛋白质组学中作为分离蛋白的核心技术, 双向凝胶电泳以其极高的分辨率在法医昆虫学方面理应能发挥其强大的分析辨别能力, 如在

基金项目: 国家自然科学基金项目(39870681)

作者简介: 李凯, 男, 1978 年 7 月生, 浙江人, 博士研究生, 研究方向为法医昆虫学, E-mail: gyee@zju.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: chu@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2004-07-05; 接受日期 Accepted: 2004-11-08

昆虫个体识别方面 ,Papura 等(2002)利用双向凝胶电泳区分了携带病毒的蚜虫的不同表达个体。我们以尸体上常见的 4 种尸食性蝇类(马玉堃等,2000)的初孵幼虫为研究对象,观察它们在双向凝胶电泳图谱上的明显差异,并通过逐步判别分析鉴别了这 4 种蝇类幼虫。

1 材料与方法

1.1 供试虫源和取样方法

大头金蝇 *Chrysomya megacephala* (Fabricius)、棕尾别麻蝇 *Boettcherisca peregrina* (Robineau-Desvoidy)、肥须亚麻蝇 *Parasarcophaga crassipalpis* (Macquart) 和巨尾阿丽蝇 *Aldrichina grahami* (Aldrich) 以采自杭州市的幼虫建立种群。于成虫产卵盛期以新鲜猪肝供其产卵,取 2 h 内所产卵接入 24℃ 培养箱中的果酱瓶内,以新鲜瘦猪肉饲养。培养箱温度为 24℃,光照时间 12 h。幼虫进入离食期后将其与饲料分开,加入干燥锯末供其化蛹。成虫羽化后置养虫笼内饲以白糖与清水。

取出所接卵块后,放入 24℃ 培养箱,每小时观察一次,待其孵化。孵化后,取 50 头初孵幼虫,用蒸馏水清洗数次后,滤纸轻轻吸去虫体表面水分,称其重,置于 1.5 mL 的 Eppendorf 离心管中于 -70℃ 保存备用。

1.2 试剂

二硫苏糖醇、尿素、SDS、甘氨酸、琼脂糖、甘油、溴酚蓝、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris、低熔点琼脂糖、碘代乙酰胺、CHAPS、过硫酸铵、TEMED、Bio-Lyte 和 IPG 干胶条(pH 4~7)均为 Bio-Rad 公司产品,其余试剂为国产分析纯,所有溶液均用 Milli-Q 水配制。

1.3 蛋白质提取方法

取出 -70℃ 冻存样品,加入 10 倍体积(W/V)的裂解液(8 mol/L 尿素、4% CHAPS、50 mmol/L DTT、40 mmol/L Tris-base 和 0.2% Biolytes, pH 4~7)后,在冰浴中匀浆,匀浆液转移至离心管中,加入 20 μg/mL DNase I 和 5 μg/mL RNase A 4℃ 冰水浴 15 min, 4℃ 12 000 × g 离心 30 min,取上清液,用 Bradford(1976)方法检测蛋白质含量,于 -70℃ 保存备用。

1.4 双向凝胶电泳

根据 Bio-Rad 说明书进行,其中第 1 向等电聚焦电压为 4 000 V,聚焦 20 000 V × h,聚焦完毕后,进行 2 次平衡,将平衡过的胶条进行第 2 向 SDS-PAGE,

凝胶浓度为 10%,电泳后,进行银染(Schevchenko *et al.*, 1996)。每种类样品重复 3 次。

1.5 蛋白质图谱扫描与分析

银染后,电泳图谱在 GS-800 (Bio-Rad) 光密度扫描仪上扫描,根据 PDQuest 软件对双向凝胶电泳图谱中的点进行了图象分析(包括蛋白点的检测、量化、背景扣除和点的匹配)。而后对蛋白点进行自动检测后的编辑。蛋白点匹配前先从中选取一块凝胶图象,PDQuest 软件分析时以棕尾别麻蝇的双向凝胶电泳图为母版胶(master gel)作为参考胶,并建立一些点作为相同的匹配点,然后根据软件自动匹配其他蛋白点。另外,根据 pH 4~7 IPG 胶条的线性关系确定每个点的等电点,并依据已知分子量标记计算各点的相对分子量。

1.6 物种鉴别模型的建立方法

将各点依据一定的等电点值与相对分子量划分到一定的区域范围之内,其中等电点值范围分为 4~4.2, 4.2~4.6, 4.6~5.0, 5.0~5.4, 5.4~5.8, 5.8~6.2, 6.2~6.6, 6.6~7.0, 分子量范围则各分为 30~40, 40~50, 50~60, 60~70, 70~80, 80~90, 90~100 kD。这样,电泳图谱的数据点可分为 56 个区域,依照等电点与分子量均从小到大的顺序依次记为 $x_1 \dots x_n \dots x_{56}$ 。聚类分析时以各个区域内点的数目作为自变量,聚类的方法为最近邻近法。判别分析则依次取该区域内从小到大的 10 个数据,不足 10 个则以该区域的下限边界值补足,超出 10 个则舍弃分子量的数据,每个数据由 2 位数据(分子量、等电点)组成,计算时取两者的平方和的算术平方根为自变量的值。利用 SPSS11.0 软件进行分析,分别把所有的变量值都代入方程并进行逐步判别分析,建立相应的推断模型。

2 结果

2.1 双向凝胶电泳图谱

4 种尸食性蝇类初孵幼虫的蛋白质组指纹图谱见图 1。从图中可见,物种之间的双向凝胶电泳图谱差异颇大,其中以肥须亚麻蝇与其他供试种类相差最大。

按 1.5 节方法计算出来的等电点与相对分子量值显示见图 2。4 种尸食性蝇类的蛋白点的分布相似,但大头金蝇除了前面的几个区域外,几乎在所有的区域都是数量最多,而棕尾别麻蝇与巨尾阿丽蝇的分布则显示出了相同的趋势,肥须亚麻蝇在各个

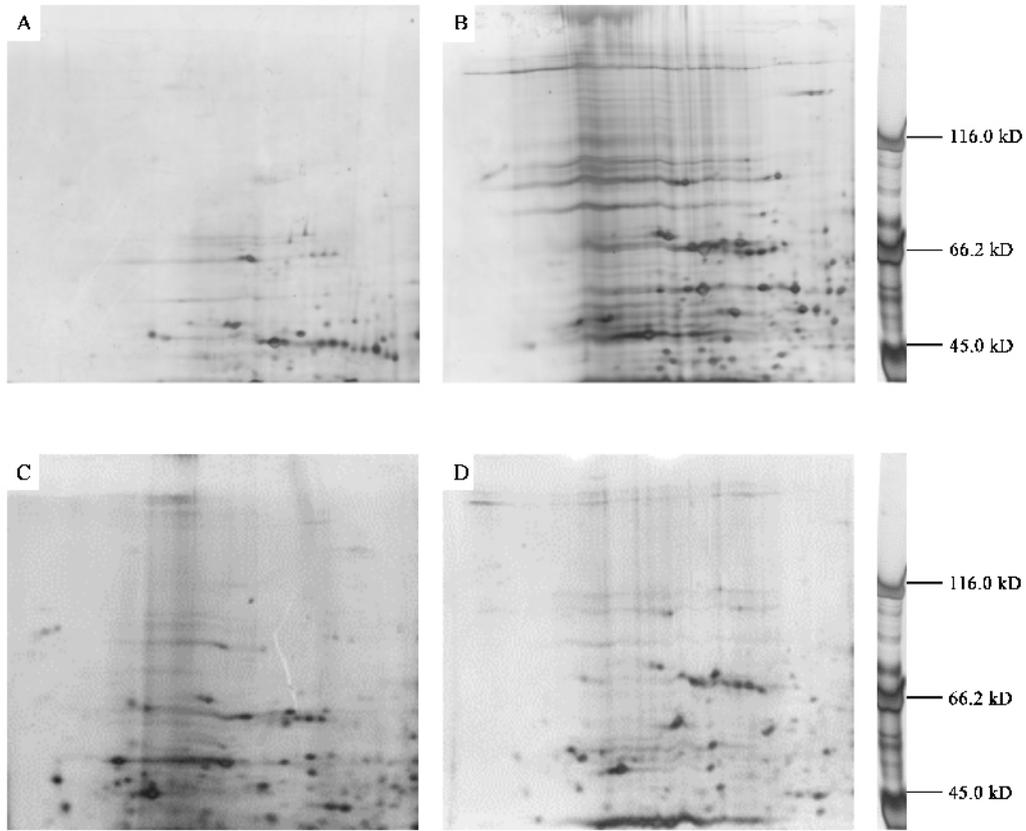


图 1 4 种尸食性蝇类初孵幼虫蛋白质组双向凝胶电泳图谱

Fig. 1 Two-dimensional gel electrophoresis finger maps for neonate larvae of four carrion-breeding fly species

A: 肥须亚麻蝇 *Parasarcophaga crassipalpis*; B: 巨尾阿丽蝇 *Aldrichina grahami*;

C: 大头金蝇 *Chrysomya megacephala*; D: 棕尾别麻蝇 *Boettcherisca peregrina*.

区域里的数量明显较少。

2.2 判别分析

2.2.1 所有区域作为自变量:应用 Fisher 判别法,对蛋白点的组成按蝇种类作判别分析,把所有的区域都作为自变量,得到 3 个未标准化判别函数,判别函数 1 与判别函数 2 在二维空间上的分布见图 3,各个种类的分布区域没有重叠,能较好的区分彼此。应用上述判别函数对 4 种尸食性蝇类进行交互验证表明,55% 的种类能被准确鉴别。

2.2.2 逐步判别:应用 Fisher 判别法,对蛋白点的组成按蝇种类作逐步判别分析,判别分析共得到 3 个未标准化的函数, χ^2 检验表明,判别函数 1 和判别函数 2 均有极显著的统计学意义($P < 0.01$)。在判别分析过程中共提取出 14 个特征变量(特征区域)。这 14 个特征区域分别为 x_{11} , x_{13} , x_{14} , x_{17} , x_{24} , x_{30} , x_{31} , x_{39} , x_{42} , x_{45} , x_{46} , x_{50} , x_{52} 和 x_{56} 。

各种蝇类初孵幼虫蛋白组成在判别函数 1 和判

别函数 2 二维空间上的分布见图 4。从图可知,这 4 个种类相应的分布区域没有重叠,能精确地加以区分。可见,应用逐步判别函数对 4 种尸食性蝇类初孵幼虫双向凝胶电泳图谱特征进行判别分析,能精确鉴别出 4 种蝇类初孵幼虫。

3 讨论

双向凝胶电泳结果表明:平行胶之间蛋白点几乎没有差异,双向凝胶电泳近几年发展迅速,尤其是商品化固相胶条的广泛使用后,各种电泳条件在优化情况下可达到非常高的分辨率,也可获得好的重复性。本研究共进行了 3 次重复,根据双向凝胶电泳软件 PDQuest 分析结果来看,差异极其微小,故文中未作统计分析。

根据母版胶得到的蛋白质组图谱匹配结果,可知 4 个种类间的蛋白质组差异显著,彼此之间根据软件匹配的成功率很低。这与基因组不同,蛋白质

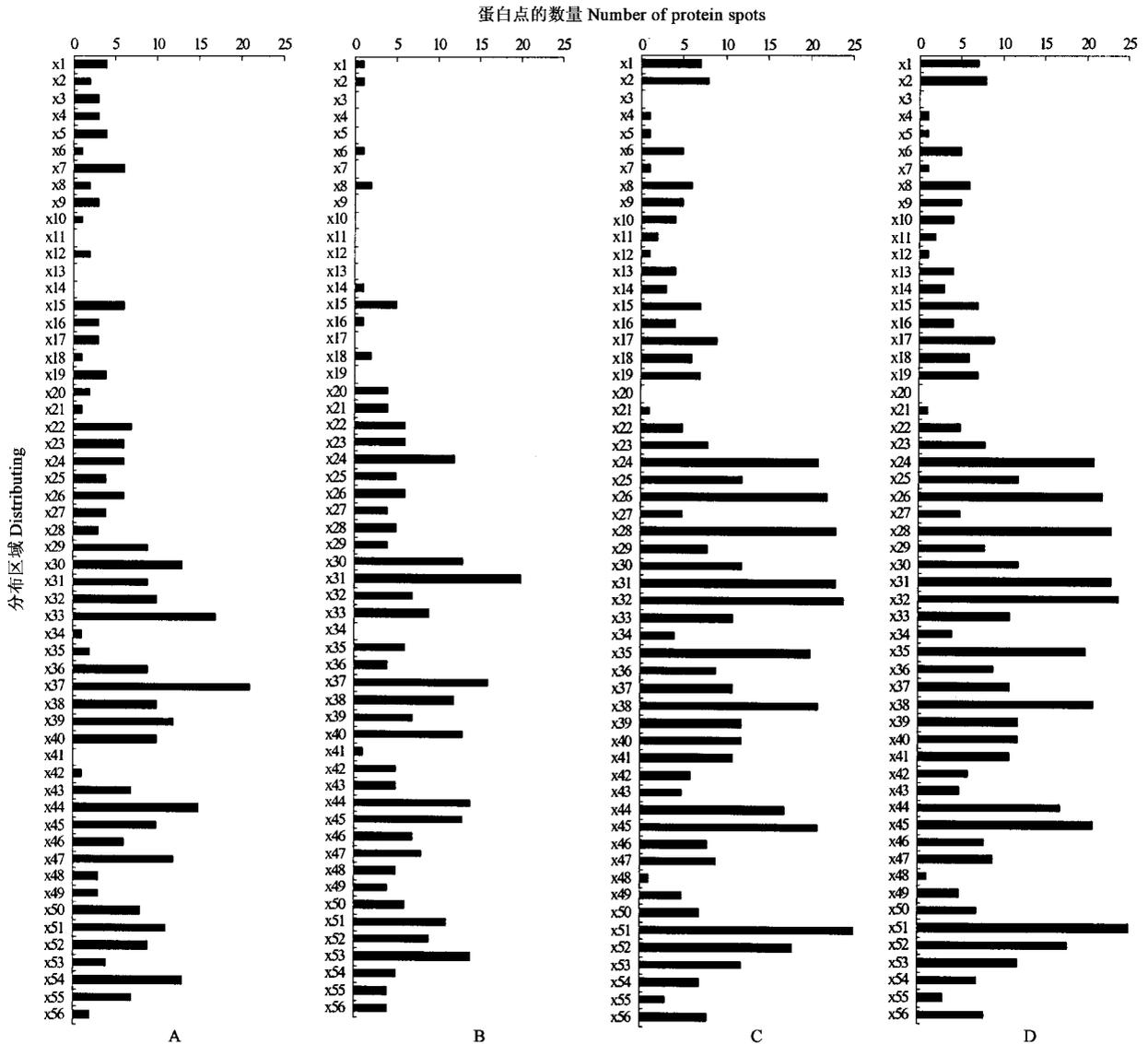


图2 4种尸食性蝇类初孵幼虫蛋白质组双向凝胶电泳点的分布比较

Fig. 2 Comparison of protein spot distribution of two-dimensional gel electrophoresis finger maps for neonate larvae of four carrion-breeding fly species

A: 肥须亚麻蝇 *Parasarcophaga crassipalpis*; B: 巨尾阿丽蝇 *Aldrichina grahami*;

C: 大头金蝇 *Chrysomya megacephala*; D: 棕尾别麻蝇 *Boettcherisca peregrina*.

组具有很高的组织细胞的特异性,而物种间的蛋白质组更是千差万别,正是这些差异使我们能够在双向凝胶电泳以后鉴别它们。从双向凝胶电泳重复性方面考虑,巨尾阿丽蝇与棕尾别麻蝇是同时进行的电泳这也保证了其有相对较多的点能够匹配成功,但是差异点数量远高于匹配点使得鉴别电泳图谱十分容易。本实验使用的固相化 pH 梯度等电聚焦电泳技术,它的可重复性使得不同实验室的结果能进行比较,这也正是本研究制作初孵幼虫蛋白质组图谱的初衷。

根据判别分析的结果可知,逐步判别分析比一般判别分析更有利于区分不同的种类(图3、图4)。

逐步判别分析在计算过程中摒弃了容易混淆鉴别的蛋白点区域,并给出了相应的可以进行判别的判别函数,而判别函数的各个自变量则是双向凝胶电泳图谱中能够区分彼此种类的蛋白点的区域。我们在判别分析中使用的变量为双向凝胶电泳图谱上的各个区域的点相对于零点的距离,这方面可以充分考虑到等电点与相对分子量,同时也能考虑到空间的分布,因为正是二维空间的差异使得我们能够区分这些种类的蛋白质组差异,从而辨别其种类。

自1994年来基于DNA技术的分子鉴定方法层出不穷,RAPD、RFLP与DNA序列测定等方法相继在法医昆虫学中的应用(Sperling, 1994; Beneck, 1999;

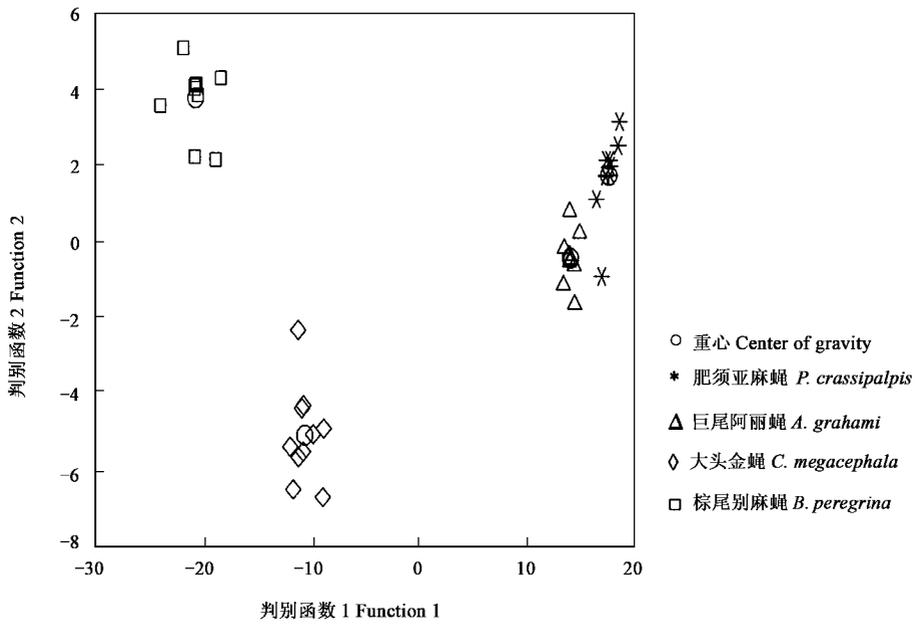


图 3 4 种蝇类初孵幼虫蛋白特征在判别函数 1 和判别函数 2 二维空间上的分布

Fig. 3 Protein spots of neonate larvae of four carrion-breeding fly species distributed in planar space 所有变量均进入自变量 All the variables as independent variables.

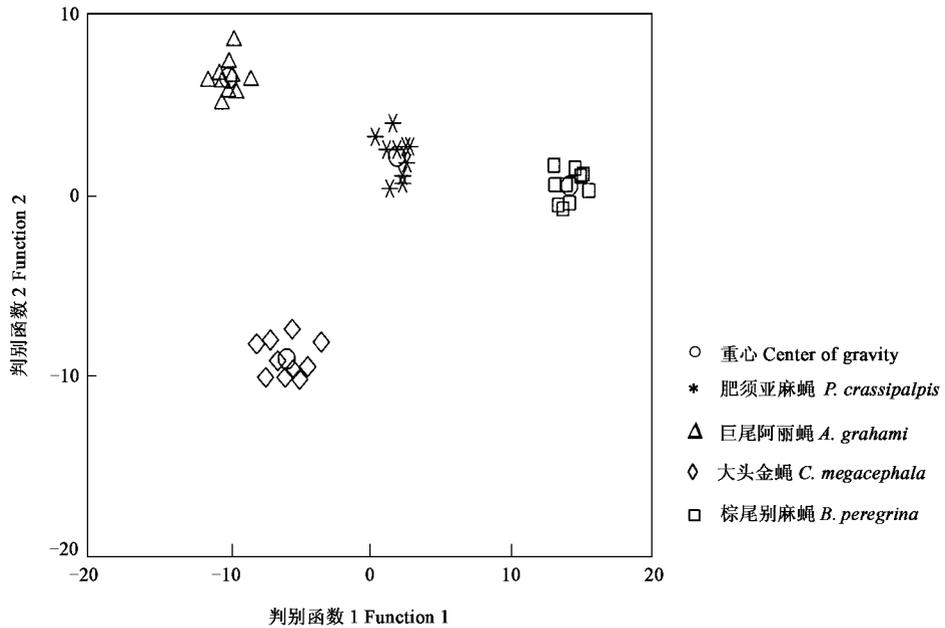


图 4 4 种蝇类初孵幼虫蛋白特征在判别函数 1 和判别函数 2 二维空间上的分布(逐步判别)

Fig. 4 Protein spots of neonate larvae of four carrion-breeding fly species distributed in planar space(stepwise discrimination)

Malgom and Coquoz , 1999),其中 mtDNA 相关片段的序列分析因其可靠稳定的特点得到了广泛的关注和研究。但是,如何从浩瀚的生物 DNA 中挑选适合所有法医昆虫或仅适合尸食性蝇类鉴定种类的片段仍是一个难题(李凯等 2003)。相比之下,蛋白质组研究则能够对基因组表达的所有蛋白质进行分离分析,在相同的生理条件下不同种类的蛋白质组差异

可以有效的通过双向凝胶电泳图谱进行区分。同时,质谱技术联接了蛋白质组学和基因组学,在图谱上那些相同的蛋白点又可以在双向凝胶电泳的基础上进行质谱鉴定,给出共同的保守基因。这些保守的基因又同时为 DNA 序列分析提供靶标位点。因此,无论是从蛋白质组图谱的差异比较分析来鉴别种类,还是为 DNA 序列分析提供目的片段来看,蛋

白质组学在法医昆虫学中的价值是巨大的。

综上所述,通过蛋白质组图谱比较找出差异明显的若干蛋白点分布区域,即能利用这些标志蛋白点区域为形态上相似的蝇类幼虫的鉴别提供帮助。同时,随着质谱技术的普遍应用,还可为其特定的DNA靶标位点的寻找与确定提供帮助。

参 考 文 献 (References)

- Andersen S, 2000. Studies on proteins in post-ecdysial nymphal cuticle of locust, *Locusta migratoria*, and cockroach, *Blaberus craniifer*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30(7): 569 – 577.
- Baggerman G, Cerstiaens A, De L, Schoofs L, 2002. Peptidomics of the larval *Drosophila melanogaster* central nervous system. *J. Biol. Chem.*, 277(43): 40 368 – 40 374.
- Benecke M, 1998. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophagous insects (Diptera, Coleoptera) in criminal forensic studies: validation and use in practice. *Forensic Sci. Int.*, 98: 157 – 168.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248 – 254.
- Byrd J, Castner J, 2001. Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigation. Boca Raton: CRC Press. 256 – 267.
- Farkas R, Washe S, Jone D, 1999. Uncoupling of sequential heteromorphic developmental programs. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 40(1): 1 – 16.
- Haddow J, Poullis B, Haines L, Gooding R, Aksoy S, Pearson T, 2002. Identification of major soluble salivary gland proteins in teneral *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(9): 1 045 – 1 053.
- Hu C, 2000. Forensic Entomology. Chongqing: Chongqing Publishing House. 303 – 309. [胡萃, 2000. 法医昆虫学. 重庆: 重庆出版社. 303 – 309]
- Li K, Ye GY, Hu C, 2003. DNA analyzing technique applied in forensic entomology. *Chinese Journal of Forensic Medicine*, 18(2): 121 – 123. [李凯, 叶恭银, 胡萃, 2003. DNA分析技术在法医昆虫学中的应用. 中国法医学杂志, 18(2): 121 – 123]
- Ma YK, Hu C, Min JX, 2000. A preliminary study on the constitution and succession of insect community on pig carcass in Hangzhou district. *Acta Entomol. Sin.*, 43(4): 388 – 393. [马玉堃, 胡萃, 闵建雄, 2000. 杭州地区猪尸体上昆虫群落的组成与演替的初步观察. 昆虫学报, 43(4): 388 – 393]
- Malgom Y, Coquoz R, 1999. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae: An interest in forensic entomology. *Forensic Sci. Int.*, 102: 111 – 119.
- Missios S, Davidson H, Linder D, Mortimer L, Okobi A, Doctor J, 2000. Characterization of cuticular proteins in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30(1): 47 – 56.
- Papura D, Jacquot E, Dedryver C, Luche S, Riault G, Bossis M, Rabilloud T, 2002. Two dimensional electrophoresis of proteins discriminates aphid clones of *Sitobion avenae* differing in BYDV-PAV transmission. *Arch. Virol.*, 147(10): 1 881 – 1 898.
- Schevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M, 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, 69(5): 850 – 858.
- Sperling FAH, Anderson GS, Hickey AD, 1994. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *J. Forensic Sci.*, 39(2): 418 – 427.
- Valenzuela J, 2002. High-through put approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(10): 1 199 – 1 209.
- Vigoreaux JO, 2001. Genetics of the *Drosophila* flight muscle myofibril: a window into the biology of complex systems. *Bioassays*, 23(11): 1 047 – 1 063.

(责任编辑: 黄玲巧)