



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Purification, Characterization, and Antibody Preparation of Vitellins of the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) 【Research report】

東方果實蠅(*Bactrocera dorsalis*)(雙翅目：果實蠅科)卵黃蛋白之純化、分析及其抗體製備【研究報告】

Hsiao-Ling Lu and Kuang-Hui Lu*
呂曉玲、路光暉*

*通訊作者E-mail: khlu@dragon.nchu.edu.tw

Received: 2002/11/20 Accepted: 2003/06/09 Available online: 2003/06/01

Abstract

The Oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)) has two vitellins (Vns), with estimated molecular weights of 48 and 51 kDa, respectively. Vns were sequentially purified from the eggs of *B. dorsalis* by salting out, ion exchange chromatography, and gel filtration chromatography. By salting out the egg homogenate, SDS-PAGE analysis revealed that the Vns were mainly precipitated in a 50~70% ammonium sulfate solution. The salted-out proteins were further purified by ion exchange chromatography, and the result showed that Vns were mainly eluted with a 0.3~0.5 M sodium chloride gradient. Finally, the elutes of ion exchange chromatography were refined by running them through gel filtration chromatography to obtain purified Vns. SDS-PAGE separated the 48- and 51-kDa purified Vns, and used them as antigens to raise polyclonal antibodies. After obtaining the antibodies, Western blotting detection of the Vns and vitellogenins (Vgs) in the hemolymph of 8-day-old male and female *B. dorsalis* and eggs showed that the antibodies were specific to Vns/Vgs; however, there were cross-reactivities between the 48- and 51-kDa Vns/Vgs.

摘要

東方果實蠅(*Bactrocera dorsalis* (Hendel))體內有兩種卵黃蛋白(vitellins, Vns)·定名為BdVg-1和BdVg-2·其分子量分別約為48及51 kDa·本研究主要在於將此蛋白經一系列的純化過程·自卵中萃取純化出來並用以製備抗體·以供探討卵黃原蛋白(vitellogenins, Vgs)之表現·利用硫酸銨(ammonium sulfate)鹽析法(salting out)初步分離果實蠅卵中的蛋白質·以SDS-PAGE蛋白質電泳分析得知·卵黃蛋白主要在硫酸銨溶液濃度為50~70%時被沉澱出;鹽析沉澱所得之卵黃蛋白·再以離子交換層析法(ion exchange chromatography)進一步純化顯示·卵黃蛋白主要會在0.3~0.5 M氯化鈉的濃度範圍間被析出來;再將析出液濃縮後·經凝膠過濾層析法(gel filtration chromatography)做最後的純化·即獲得純化之卵黃蛋白·以純化得之卵黃蛋白為抗原·製備抗體·所得抗體以西方墨點法(Western blotting)偵測第8日齡雌、雄成蟲血液與卵研磨液·結果顯示此抗體對東方果實蠅卵黃(原)蛋白之反應具專一性·但是此抗體對48及51 kDa卵黃(原)蛋白則具交互作用·亦即對辨識兩個卵黃原蛋白不具專一性。

Key words: Oriental fruit fly, vitellin, vitellogenin, polyclonal antibody

關鍵詞: 東方果實蠅、卵黃蛋白、卵黃原蛋白、抗體

Full Text: [PDF \(1.72 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

東方果實蠅(*Bactrocera dorsalis*)(雙翅目：果實蠅科)卵黃蛋白之純化、分析及其抗體製備

呂曉玲 路光暉* 國立中興大學昆蟲學系 台中市 402 國光路 250 號

摘要

東方果實蠅(*Bactrocera dorsalis* (Hendel))體內有兩種卵黃蛋白(vitellins, Vns),定名為BdVg-1和BdVg-2,其分子量分別約為48及51 kDa,本研究主要在於將此蛋白經一系列的純化過程,自卵中萃取出來並用以製備抗體,以供探討卵黃原蛋白(vitellogenins, Vgs)之表現。利用硫酸銨(ammonium sulfate)鹽析法(salting out)初步分離果實蠅卵中的蛋白質,以SDS-PAGE蛋白質電泳分析得知,卵黃蛋白主要在硫酸銨溶液濃度為50~70%時被沉澱出;鹽析沉澱所得之卵黃蛋白,再以離子交換層析法(ion exchange chromatography)進一步純化顯示,卵黃蛋白主要會在0.3~0.5 M氯化鈉的濃度範圍間被析出來;再將析出液濃縮後,經凝膠過濾層析法(gel filtration chromatography)做最後的純化,即獲得純化之卵黃蛋白。以純化得之卵黃蛋白為抗原,製備抗體,所得抗體以西方墨點法(Western blotting)偵測第8日齡雌、雄成蟲血液與卵研磨液,結果顯示此抗體對東方果實蠅卵黃(原)蛋白之反應具專一性,但是此抗體對48及51 kDa卵黃(原)蛋白則具交互作用,亦即對辨識兩個卵黃原蛋白不具專一性。

關鍵詞：東方果實蠅、卵黃蛋白、卵黃原蛋白、抗體

前言

多數昆蟲卵生成的過程(oogenesis)最重要的事,即是累積卵細胞(oocytes)內的卵黃(yolk)。昆蟲的卵黃為醣類、脂類及蛋白質的混合體,其中以蛋白質含量為最多,之中又以卵黃蛋白(vitellins, Vns)為最重要,約佔有80-90%總蛋白量(Kunkel and Nordin, 1985),提供後續胚胎發育時所需的營養。卵

黃原蛋白(vitellogenins, Vgs)為卵黃蛋白之前驅物質,屬寡磷酸醣酯蛋白(oligomeric phosphoglycolipoproteins),包含數個分子量大小範圍在50-180 kDa單體所組成(Harnish and White, 1982; Kunkel and Nordin, 1985),卵黃蛋白與卵黃原蛋白兩者的一般性質相當接近,分子量大小相似之外,等電點皆約為6.1-6.3 (Engelmann, 1979; Hagedorn and Kunkel, 1979; Raikhel and Dhadialla,

*論文聯繫人
e-mail:khlu@dragon.nchu.edu.tw

1992)。Harnish 和 White (1982)將昆蟲的卵黃原蛋白根據其分子量大小和構成之蛋白質數目分成三大類：第一類包含分子量約 100-180 及 47-80 kDa 的兩個蛋白質，大部分昆蟲屬於此類；第二類包含分子量約 170-190 kDa 的單一蛋白質，包括大多數膜翅目 (Hymenoptera) 與低等雙翅目 (lower Diptera)；第三類包含分子量約 50 kDa 的蛋白質，高等雙翅目 (higher Diptera) (指雙翅目環裂亞目，Cyclorrhapha) 昆蟲屬之。

卵黃形成作用 (vitellogenesis) 包含卵黃原蛋白的合成、分泌及攝入發育中的卵細胞，並以卵黃蛋白形式儲存於卵細胞中。大多數昆蟲卵黃原蛋白在賀爾蒙調控下，自脂肪體 (fat body) 合成釋入血體腔，經血循環至卵巢 (ovary)，被發育中的卵細胞吸收 (Engelmann, 1979; Bownes and Blair, 1986; Rina and Mintzas, 1987; Izumi *et al.*, 1994)。然而在多數的高等雙翅目昆蟲，卵黃原蛋白除了在脂肪體製造外，卵巢的卵囊細胞內亦會合成，且與在脂肪體所製造的卵黃原蛋白並無差異性，例如在地中海果實蠅 (*Ceratitis capitata*) (Rina and Mintzas, 1987)、橄欖果實蠅 (*Dacus oleae*) (Levedakou and Sekeris, 1987; Trougakos *et al.*, 1999)、與黃果蠅 (*Drosophila melanogaster*) (Brennan *et al.*, 1982; Bownes and Blair, 1986)，其中黃果蠅卵黃原蛋白是由卵巢負責產生 35% YP1 以及 YP2，而 YP3 只有 12%。

昆蟲卵黃原蛋白為雌成蟲產量最豐富的蛋白質，除顯示其基因活性高外，其蛋白質表現亦受到如激素、性別與發育期等因素之影響，素來均為研究昆蟲基因表現調控機制的對象之一。本研究的目的主要在於純化東方果實蠅 (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)) 卵黃蛋白，並製備卵黃蛋白專一性抗體，利用抗體與

抗原結合具專一性的特性，可定性與定量標定與分析卵黃 (原) 蛋白在東方果實蠅體內之組織分布與表現量的變化等，藉此得以深入就分子層面探究東方果實蠅卵黃形成作用所受到的調控機制。本研究結果顯示經由一系列不同的純化步驟，我們可以自卵中純化得卵黃蛋白，同時藉此已製備得具有專一性之多株抗體 (polyclonal antibody)，可供日後使用。

材料與方法

一、供試蟲源

本研究所使用之東方果實蠅為本研究室內建立之穩定族群。幼蟲參考 Chiu (1978) 之培養基配方與飼養法飼養，成蟲以 20% 蛋白朊、20% 酵母抽出物與 60% 糖之人工飼料飼養於 30 立方公分之網箱中，成蟲與幼蟲均飼養於 $28\pm 1^\circ\text{C}$ ，光週期 12L:12D 之養蟲室中。

除另有敘述，本研究所使用的蟲體均為初羽化即分籠飼育之處女雌、雄成蟲。

二、蛋白質樣品之來源與製備

1. 卵研磨液之來源與製備

取第 10~30 日齡間之雌成蟲，於日間 12 至 18 時，以芭樂汁誘引其產卵，收集得的卵以水洗淨後，於 4°C 下加入 2 倍體積之 phosphate buffer saline (PBS; 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na_2HPO_4 , 0.024% KH_2PO_4 , 0.02% NaN_3 , 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7.4)，以細胞均質器 (Polytron PT-MR 3000, KINEMATICA AG, Littau-Switzerland) 研磨 10 min，於 4°C 下以 15000g 離心 1 h，再以紗布過濾。所得濾液即為卵研磨液，做為純化卵黃蛋白之來源，存於 -20°C 備用。

2. 血液樣品之製備

以低溫冰昏第 8 日齡雌、雄蟲後，將毛細管自胸部節間膜刺入，採集血液並將之收集於微量離心管中，收集管中則事先加入微量 phenylthiourea (PTU)防止血液黑化，在 4 °C 下以 10000g 離心 5 min 去除雜質，上清液存於-20°C 備用。

三、卵黃蛋白之純化

本研究以三種純化方法，鹽析法(salting out)、離子交換層析法(ion exchange)及凝膠過濾層析法(gel filtration)，進行卵黃蛋白質的純化，全程於 4°C 下進行。

1. 鹽析法

取飽和硫酸銨((NH₄)₂SO₄)溶液緩緩加入卵研磨液，直至溶液濃度含 40% 硫酸銨並持續攪拌 1 h，以 10000g 離心 20 min 後，所得之上清液重複上述步驟，每次再加入適量的硫酸銨，使之分別得到在 50、60、70 及 80% 硫酸銨溶液下沉澱之蛋白質；所得的沉澱物分別以 1 倍體積之 PBS 回溶，再以 10000g 離心 5 min，之後將上清液分別移至透析膜 (Snakeskin pleated dialysis tubing 7000 MWCO; Pierce, Rorkford, IL, USA)中，用大量的 PBS 透析 24 h 以去除上清液中之鹽類。經由 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析之結果，以最適當的濃度區間大量收集含卵黃蛋白樣品存於-20°C 備用。

2. 離子交換層析法

將 1 ml (10 mg/ml)鹽析所得的樣品注入 Q Sepharous Fast Flow (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)色層分析管柱 (20 × 0.25 cm)，以液相色層分析儀(liquid chromatography; ISCO, Lincoln, NE, USA)在緩衝液(20 mM Tris-HCl, pH 7.6)中，氯化鈉濃度以 0~1.0 M 線性增加及流速 120 ml/h 的條件下分離蛋白質，並於波長 280

nm 下檢測蛋白質，配合分離液收集器以 2 min/tube 收集析出之溶液。

利用層析光譜圖及配合 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析，將含有卵黃蛋白的析出液大量收集，並以蛋白質濃縮器(Amicon, Bedford, MA, USA)配合 30K 濾膜(YM30, Amicon)將之濃縮約 100 倍，其間並加入約一倍體積之緩衝液(20 mM Tris-HCl, pH 7.6)將所含之少量鹽類析出，濃縮過後之樣品存於-20°C 備用。

3. 凝膠過濾層析法

取 1.5 ml (1.8 mg/ml)上述濃縮過後之樣品，以緩衝液(20 mM Tris-HCl, pH 7.6)配合含 Sephacryl S-200 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)之色層分析管柱(90 × 1 cm)，以流速 30 ml/h 及波長 280 nm 偵測下分離樣品，並配合分離液收集器以 10 min/tube 收集析出之溶液。

利用層析光譜圖及配合 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析，大量收集含有卵黃蛋白的析出液後，以前述方式加以濃縮，即得經純化之卵黃蛋白。

四、蛋白質定量

蛋白質樣品濃度的測定是以 bicinchoninic acid (BCA, Pierce)蛋白質定量系統定量，以 bovine serum albumin (BSA, Pierce)為標準蛋白質。將 100 µl 樣品加入 2 ml BCA 混合液，在 60°C 下反應 30 min，以分光光譜儀 (150-20 spectrophotometer, Hitachi, Tokyo, Japan)波長 562 nm 下測其吸光質，將標準蛋白質之吸光質換算成回歸曲線，並計算出測試樣品之蛋白質濃度。

五、蛋白質電泳分析

蛋白質電泳分析係參考 Lammler (1970)

之方法進行。測定蛋白質濃度後，以 Tris-EDTA (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7.6)稀釋定量，再與 6 倍的 sample buffer (62.5 mM Tris, 30% glycerol, 6 mM 1,4-dithiothreitol, 3.5 mM SDS, 1.7 mM bromophenol blue)混和，於 100°C 加熱 5 min 後進行電泳分析。電泳所使用的分子大小標誌為 BIO-RAD prestained SDS-PAGE standards (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA)。

另製作 1.6 mm, 16 × 13 cm 之 5~20% SDS-PAGE 電泳膠片，用 BIO-RAD PROTEAN™ II Cell (BIO-RAD Laboratories)電泳裝置系統，以電壓 120 V 進行電泳 8 h。電泳完畢利用 Coomassie brilliant blue R-250 染色法或銀染(silver stain)法偵測電泳結果。

六、抗體製備

1. 抗原之準備

製作 0.8 mm, 12.5% SDS-PAGE 蛋白質電泳膠片，並在上層留有 13 cm 寬的槽，以 800 µg 純化之卵黃蛋白進行電泳，電泳結束及染色與脫色後，以刀片分別割下兩個緊鄰的卵黃蛋白，並以少量 PBS 分別浸潤與研磨，以膠體研磨液為抗原來源製備抗體。

2. 抗體之製備

在正值產卵期的母雞胸部肌肉找四個注射點，注射膠體研磨液，第一次注射時以 1 ml 研磨液與 1 ml 完全佐劑(complete Freund's adjuvant; Sigma, St. Louis, MO, USA)充分混和，每一點注射 0.5 ml，七天後注射第二次。第二次以後的注射是以 1 ml 研磨液與 1 ml 不完全佐劑(incomplete Freund's adjuvant; Sigma)充分混和，每隔七天注射一次並開始收集雞蛋，萃取抗體。另取注射抗原

前的雞蛋做為免疫對照。

3. 抗體之萃取

取雞蛋黃，加入 40 ml 0.1 M potassium phosphate buffer (PPB, 86.6% K₂HPO₄, 13.4% KH₂PO₄, pH 7.6)，攪拌均勻後，徐徐加入 3.5% polyethylene glycol 6000 (PEG 6000, Merck, Darmstadt, Germany)並持續攪拌 10 min；以 13000g 離心 10 min，上清液加入 12% PEG 6000，離心 10 min 後，沉澱物加入 5 ml PPB 回溶，再加入 12% PEG 6000，離心 10 min 後，將沉澱物加入 PPB 回溶，再加入等體積之 50% 冰酒精，離心 30 min 後，沉澱物以 2.3 ml PPB 回溶，即得純化之卵黃蛋白抗體，保存於-70°C 備用。

七、西方墨點法 (Western blotting)

製作 0.8 mm, 8.5 × 5.5 cm 之 12.5% SDS-PAGE 蛋白質電泳膠片，用 BIO-RAD MINI-PROTEAN™ II Cell (BIO-RAD Laboratories)電泳裝置系統，以電壓 100 V 下進行電泳，電泳結束後以 BIO-RAD Trans-Blot Cell (BIO-RAD Laboratories)系統於轉漬溶液(25 mM Tris, 190 mM glycine, 20% methanol, pH 8.3)中以 250 mA 轉漬 2.5 h;蛋白質轉漬到 PVDF 轉漬膜 (Hybond-P, Amersham, Buckinghamshire, England)上後，將膜置於填塞溶液(62.5 mM Tris, 1.2 mM EDTA, 0.05% Tween-20, 5% non-fat powdered milk, pH 7.4)中 1 h，加入以 PBST(含 0.5% Tween-20 之 PBS) 1: 500 比例稀釋之卵黃蛋白抗體作用 1.5 h，再置換成以 PBST 1: 1000 比例稀釋之二次抗體 (goat anti-chicken IgG conjugate with peroxidase; Sigma)作用 1 h，置換前後以 NET buffer (147 mM NaCl, 50 mM Tris, 6.3 mM EDTA, 0.25% gelatin, pH 7.4)搖洗

10 min 三次，最後以呈色劑 (15% 4-chloro-1-naphthol, 5% methanol, 0.3% H₂O₂, 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.4) 呈色，並加入蒸餾水終止反應。

結 果

一、東方果實蠅的卵黃蛋白

以 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析比較東方果實蠅第 8 日齡雌、雄蟲血液以及卵研磨液之結果顯示於圖一。由電泳圖譜得知，其中分子量分別約為 48 及 51 kDa 的兩個蛋白質是卵內主要的蛋白質，且此兩種蛋白質亦同時存在雌蟲血液中，但雄蟲血液中則並不存在，因此我們認為雌蟲血液內特有的這兩個蛋白質即為卵黃原蛋白，而在卵內則稱為卵黃蛋白。

二、卵黃蛋白的純化

萃取卵黃蛋白的過程中，首先係將卵研磨液以不同濃度硫酸銨進行鹽析，結果由 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析顯示，雖然在低於 50% 的硫酸銨溶液下即有少量卵黃蛋白被析出，但卵黃蛋白主要是會在 50~70% 硫酸銨溶液下被析出，其中又有 60~70% 為最多 (圖二)。

鹽析法雖然可去除多數其他非卵黃蛋白的蛋白質，但由電泳分析結果仍可發現其他蛋白質也會同時沉澱，於是進一步以離子交換法進行純化。將鹽析所得之卵黃蛋白液，再次經由離子交換樹脂進行純化，由吸收光譜圖得知第 12~20、30~50、58~65 和 70~75 號集液管處，可看出四個明顯的 UV₂₈₀ 吸收峰，表示鹽析得之蛋白質被分離成四個主要部分 (圖三 A)，其中又以第二個吸收峰為最主要的蛋白質析出處；進一步取四個吸收峰所收集得的蛋白質樣品，經由 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析，

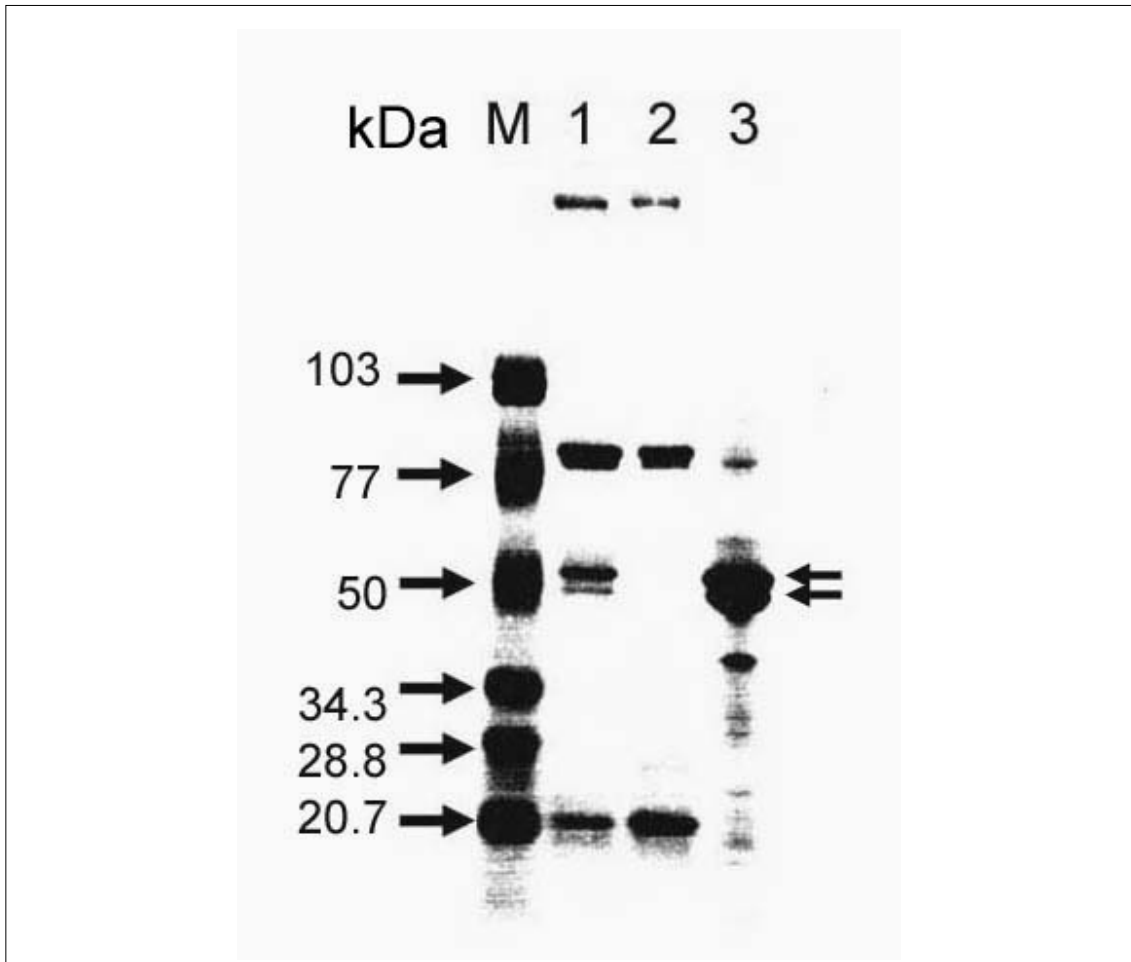
結果顯示於第 38 與 39 兩收集管中含的卵黃蛋白最多，表示卵黃蛋白主要會在第二吸收峰，亦即在 0.3~0.5 M 氯化鈉的濃度範圍間，被純化出來，且已除去大部分非卵黃蛋白的蛋白質 (圖三 B)。

為將經離子交換純化所得的卵黃蛋白更進一步地純化，同時希望能將兩個卵黃蛋白分開，因此繼續將離子交換純化所得之卵黃蛋白樣品，以凝膠過濾層析法進行再次純化，結果所得之吸收光譜圖顯示，第 24-29 號集液管處具一個明顯的吸收峰，而其前後則另有兩個小吸收峰 (圖四 A)；進一步將此主要吸收峰所得之樣品與前兩種純化處理所得樣品相比較，經由 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析的結果得知，此第二個吸收峰中確實含有大量純化的 48 及 51 kDa 卵黃蛋白，但此法仍不能將兩個卵黃蛋白分離於不同的集液管中 (圖四 B)。除此之外，第一個吸收峰含有少量非卵黃蛋白之蛋白質。

由上述結果可見經此三純化步驟可得到純度相當高的卵黃蛋白，於是經大量收集第二個吸收峰中之蛋白質並濃縮，用以製備抗體。

三、卵黃蛋白的多株抗體製備

當製備並純化得抗東方果實蠅卵黃蛋白之抗體後，以 51 kDa 卵黃蛋白膠體研磨液所製備得之抗體進行西方墨點法，偵測第 8 日齡雌、雄蟲血液與卵研磨液，結果顯示此抗體對卵內卵黃蛋白具有專一性結合，且對雌蟲血液內卵黃原蛋白亦會結合，對其他蛋白質及雄蟲血液蛋白則不具結合反應 (圖五)；另以 48 kDa 卵黃蛋白所製作之抗體進行西方墨點法偵測亦得到同樣結果 (資料未示出)。此等結果顯示本次製備所得之抗體對東方果實蠅卵黃 (原) 蛋白的結合確實具專一性，唯對兩卵黃蛋白彼此間則顯現交互結合的現象。



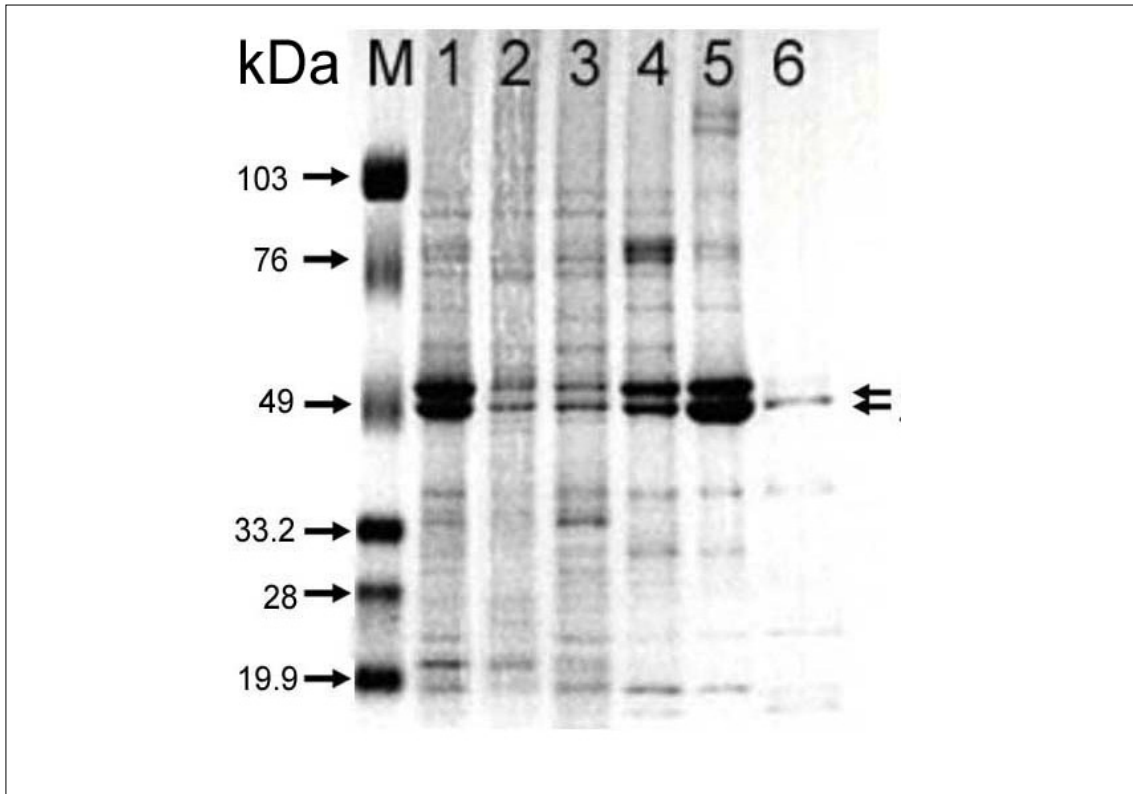
圖一 東方果實蠅血液及卵之蛋白質電泳分析圖譜。Lane 1:第 8 日齡雌蟲血液(50 μg)，Lane 2:第 8 日齡雄蟲血液(50 μg)，Lane 3:卵研磨液(25 μg)；蛋白質以 5~20% SDS-PAGE 蛋白質電泳分離以及 Coomassie blue 染色分析。圖右箭頭標示者為卵黃(原)蛋白，其分子量大小約為 48 及 51 kDa。M：蛋白質分子量標準標誌(50 μg)。

Fig. 1. Electrophoretic profiles of hemolymph and egg proteins of the Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. Lane 1: 8-day-old female hemolymph (50 μg); lane 2: 8-day-old male hemolymph (50 μg); lane 3: egg homogenates (25 μg). Proteins were separated on 5~20% SDS-PAGE gels and stained with Coomassie blue. The arrows on the right indicate the vitellins/vitellogenins, with estimated molecular weights of about 48 and 51 kDa, respectively. M: molecular weight standard markers (50 μg).

討 論

由於卵黃形成作用之重要性，以及其受蟲期發育、激素以及性別所調控的複雜性，使得許多研究人員投入研究的行列。Raikhel 和

Dhadialla (1992)指出高等雙翅目的卵黃原蛋白係由 2-5 個分子量介於 40-54 kDa 大小的分子所組成。目前已發表有關果實蠅科昆蟲卵黃原蛋白研究的結果顯示，橄欖果實蠅有兩個主要的卵黃原蛋白 Vg-1 (45 kDa) 和 Vg-2 (43 kDa) (Levedakou and Sekeris, 1987;



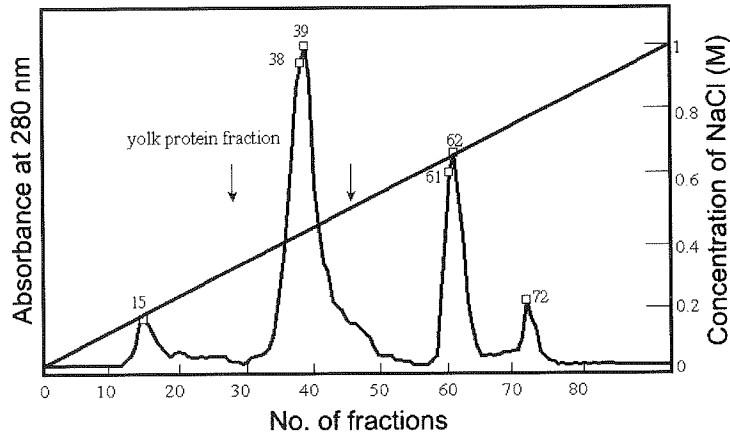
圖二 硫酸銨鹽析東方果實蠅卵研磨原液所得蛋白質之電泳分析圖譜。Lane 1: 卵研磨原液(25 μ g); Lanes 2~6: 分別為 0~40、40~50、50~60、60~70 和 70~80% 硫酸銨溶液中沉澱之蛋白質(25 μ g); 蛋白質以 5~20% SDS-PAGE 蛋白質電泳分離以及 Coomassie blue 染色分析。圖右箭頭標示者為卵黃蛋白, 其分子量大小約為 48 及 51 kDa。M: 蛋白質分子量標準標誌(25 μ g)。

Fig. 2. Electrophoretic analysis of salted-out proteins of egg homogenates of *Bactrocera dorsalis*. Lane 1: egg homogenate (25 μ g); lanes 2~6: precipitated proteins under 0~40, 40~50, 50~60, 60~70, and 70~80% ammonium sulfate, respectively (25 μ g). Proteins were separated on 5~20% SDS-PAGE gels and stained with Coomassie blue. The arrows on the right indicate the vitellins with estimated molecular weights of about 48 and 51 kDa, respectively. M: molecular weight standard markers (25 μ g).

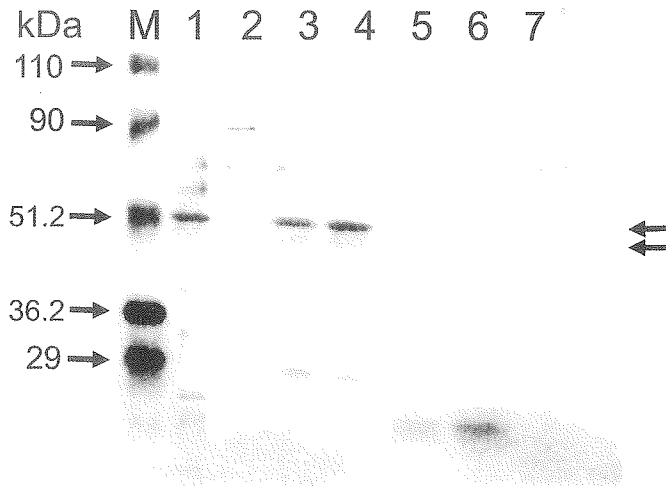
Zongza and Dimitriadis, 1988; Trougakos *et al.*, 1999), 加勒比海果實蠅 *Anastrepha suspensa* (Loew) 亦具有兩個分子量接近的卵黃原蛋白(Handler and Shirk, 1988), 而地中海果實蠅亦具兩個卵黃原蛋白 Vg-1 (49 kDa)和 Vg-2 (46 kDa), 且其在脂肪體及卵巢均會合成卵黃原蛋白(Rina and Mintzas, 1987); 至於東方果實蠅, 經由 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析結果, 證實雌成蟲體血液內含有

兩個卵黃原蛋白, 其分子量分別約為 48 與 51 kDa, 且與卵內卵黃蛋白分子量大小相同。此等研究結果顯示在果實蠅類昆蟲體內似乎均具有兩各卵黃原蛋白, 此與黃果蠅具有三個及家蠅具有三個以上的卵黃原蛋白不同。

就純化的方法與其他卵黃蛋白之研究相比較, 在半翅目(Heteroptera)的紅椿象 *Dysdercus koenigii* (Venugopal and Kumar, 1999)、地中海果實蠅(Rina and



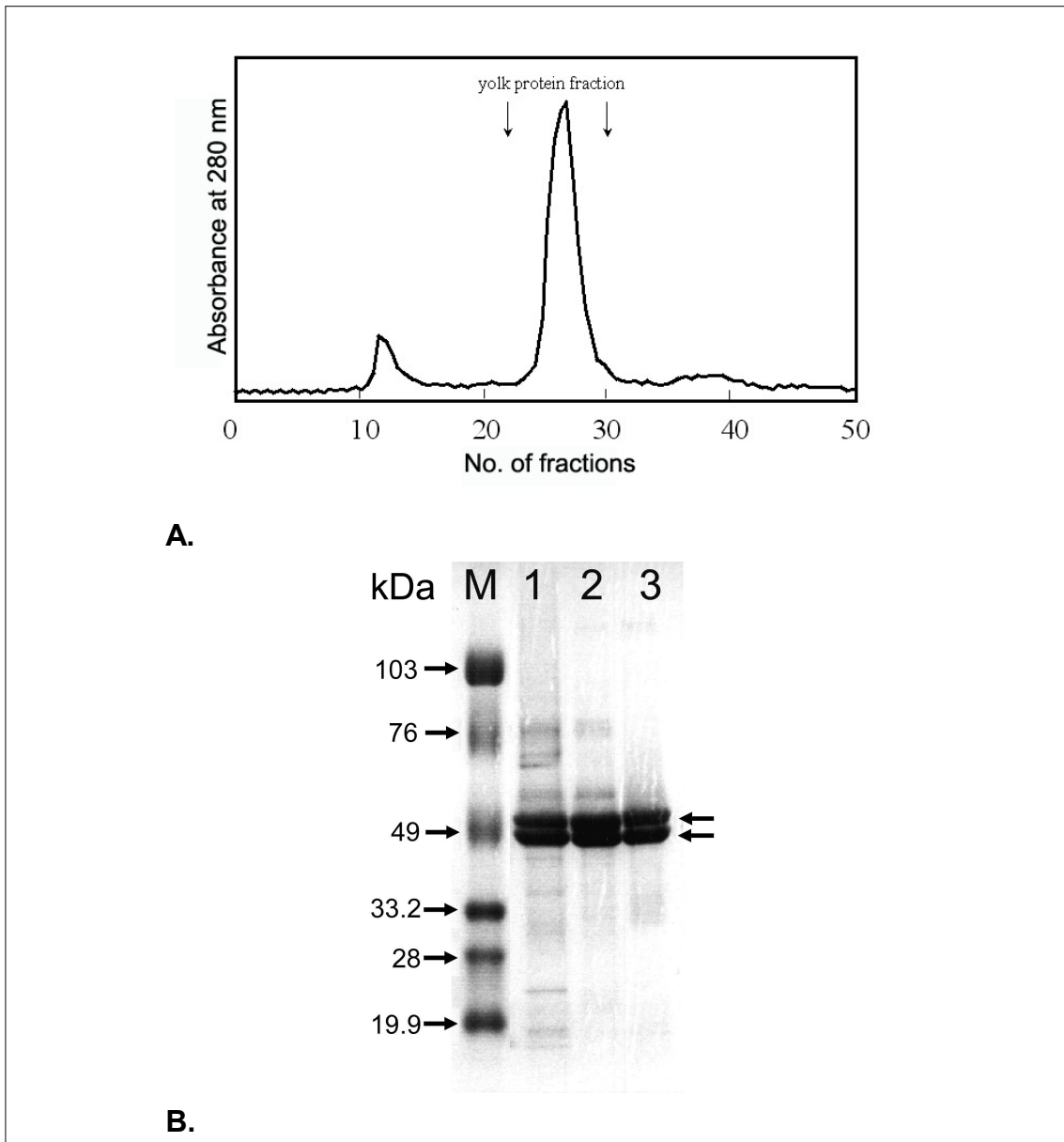
A.



B.

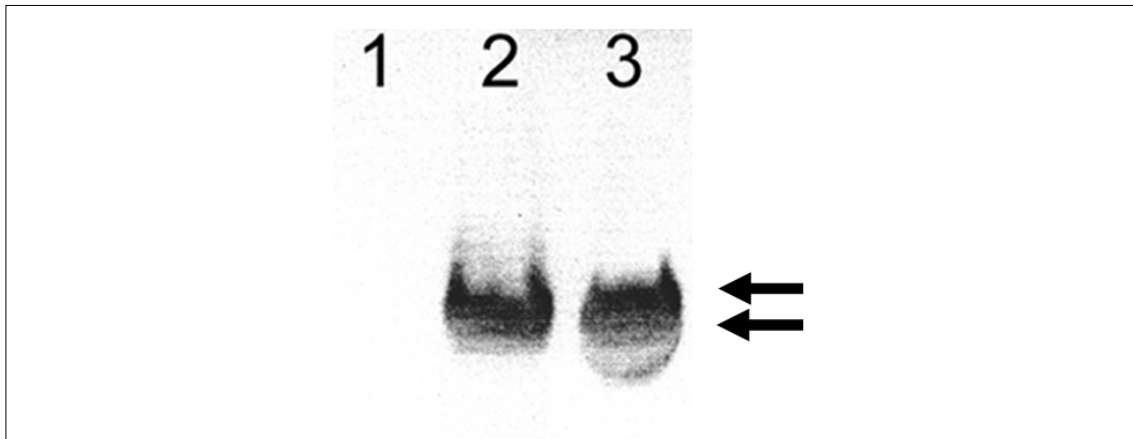
圖三 離子交換樹脂色層分析純化鹽析得之東方果實蠅卵黃蛋白之層析圖譜(A)及電泳分析圖譜(B)。A、層析係以 Q Sepharous Fast Flow (20 × 0.25 cm)離子交換法，在流速 120 ml/h 及 2 min/tube 的條件下，以線性增加之 0~1.0 M 氯化鈉分離 10 mg 硫酸銨萃取之蛋白質。圖下橫軸標示為收集試管之編號；兩箭頭間之區域標出蛋白質收集範圍。B、以 5~20% SDS-PAGE 蛋白質電泳及銀染染色分析 A 光譜圖上吸收峰中標示管號之析出物。Lane 1: 以 50~70%硫酸銨萃取之蛋白質，Lanes 2~7:分別為第 15、38、39、61、62 及 72 管所收集之樣品(50 μl)；圖右箭頭標示者為卵黃蛋白，其分子量大小約為 48 及 51 kDa；M:蛋白質分子量標準標誌(5 μg)。

Fig. 3. Profiles of ion exchange chromatography (A) and protein electrophoretic analysis (B) of the vitellins of *Bactrocera dorsalis*. A. Ten milligrams of salted-out protein was purified by passing through a Q Sepharous Fast Flow column (20 × 0.25 cm) with a linear sodium chloride gradient and a 120-ml/h flow rate, and collected in 2 min/tube. The numbers on the abscissa are the tube number of fractions, and the region between the two arrows indicates the fractions of vitellins collected. B. The salted-out protein (lane 1, 50 μl) and tubes 15, 38, 39, 61, 62 and 72 (lanes 2~7, respectively; 50 μl) were detected with a 5~20% SDS-PAGE and stained with silver staining. The arrows on the right indicate the vitellins, with estimated molecular weights of about 48 and 51 kDa, respectively. M: molecular weight standard markers (5 μg).



圖四 凝膠過濾色層分析東方果實蠅卵黃蛋白之層析圖譜(A)及電泳分析圖譜(B)。A、凝膠過濾純化係取經離子交換法純化之蛋白質(2.7 mg)，以 Sephacryl S-200 (90 × 1 cm)在流速 30 ml/h 及 10 min/tube 的條件下，再次純化卵黃蛋白。兩箭頭間之區域指出卵黃蛋白存在之吸收峰位置。B、以 5~20% SDS-PAGE 蛋白質電泳及 Coomassie blue 染色分析 A 光譜圖上吸收峰中標示管號之析出物。Lane 1: 50~70% 硫酸銨純化之蛋白質(30 μg); lane 2: 離子交換法所純化之蛋白質(30 μg); lane 3: 光譜圖第二個吸收峰之蛋白質(30 μg); M: 蛋白質分子量標準標誌(25 μg)。

Fig. 4. Profiles of gel filtration chromatography (A) and protein electrophoretic analysis (B) of the vitellins of *Bactrocera dorsalis*. A. About 2.7 mg of ion exchange-purified protein was polished by passing it through a Sephacryl S-200 column (90 × 1 cm) with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) and in a 30-min/h flow rate, and collected in 10 min/tube. The numbers on the abscissa are the tube number of fractions, and the region between the two arrows indicates the fractions of vitellins collected. B. Gel filtration-purified protein (lane 3, 30 μg) was compared to the proteins which were purified by salting out (lane 1, 30 μg) and by ion exchange chromatography (lane 2, 30 μg), with 5~20% SDS-PAGE and Coomassie blue staining. M: molecular weight standard markers (25 μg).



圖五 以抗 51 kDa 卵黃蛋白之抗體進行西方墨點法偵測東方果實蠅 8 日齡雄蟲血液(lane 1, 20 µg)、雌蟲血液(lane 2, 20 µg)及卵萃取液(lane 3, 5 µg)。抗體稀釋倍數為 1: 500。

Fig. 5. Western blot analysis of the hemolymph of 8-day-old males (lane 1, 20 µg), females (lane 2, 20 µg), and egg extract (lane 3, 5 µg) of *Bactrocera dorsalis* using antibody (1:500) against 51-kDa Vns.

Mintzas, 1987)與加勒比海果實蠅(Handler and Shirk, 1988)卵黃蛋白之研究中，純化之方法是先利用凝膠過濾法萃取經鹽析法純化之蛋白質樣品，再用離子交換法進一步進行純化。但在我們的研究中蛋白質樣品若是先以凝膠過濾法純化 50~70% 硫酸銨溶液下沉澱之蛋白質樣品，再經離子交換法純化，結果並不能達到相同的純化效果(資料未示出)，而由結果可見東方果實蠅卵黃蛋白依序經本研究所使用的三種純化步驟，可得到純度相當高的卵黃蛋白。

多數昆蟲卵黃原蛋白與卵黃蛋白差異很小，通常只在水含量上有差別，其餘在分子量大小、氨基酸、脂質、碳水化合物之組成皆相同(Kunkel and Nordin, 1985)。而在我們的實驗結果中，純化之卵黃蛋白所製備的抗體亦會與卵黃原蛋白結合，這與我們所預期的結果相同；然而比較可惜的一點是原本希望能夠分別偵測兩個卵黃(原)蛋白，但無論利用 48 或 51 kDa 卵黃蛋白所製備得之抗體進行西方

墨點法，均無法專一性的各別偵測到兩種卵黃(原)蛋白，顯示此兩個卵黃(原)蛋白的分子構造與特性很相近，因此多株抗體無法區辨。類似的結果在其他雙翅目昆蟲也存在，例如地中海果實蠅兩個卵黃原蛋白 Vg-1 和 Vg-2 具有非常相似的物理化學及免疫上的性質，且其氨基酸組成序列幾乎相同(Rina and Mintzas, 1987)，因此多株抗體無法分別辨認兩個卵黃(原)蛋白，而不僅同種的兩個卵黃(原)蛋白抗體會互相反應，在不同種也會互相產生反應，例如在加勒比海果實蠅與黃果蠅的抗卵黃蛋白抗體即有互相作用的現象(Handler and Shirk, 1988)。雖然本研究所製備得的多株抗體，在兩個不同的卵黃蛋白間會產生交互辨認的現象，但是測試結果亦顯示此兩抗體均對卵黃(原)蛋白以外的其他蛋白質不具反應，此不但證明了純化所得的卵黃蛋白的純度相當高外，亦可證明其對於標示卵黃蛋白具有專一性，仍可用於相關辨識卵黃(原)蛋白的工作上。

蛋白質的純化與抗體的製備是探討蛋白質表現不可或缺的步驟之一。利用抗體對抗原彼此結合同專一性的特性，可用以定性與定量分析特定蛋白質在體內的表現情形，同時亦可用以標定此蛋白質在組織內的分布。綜合我們的研究結果得知，東方果實蠅體內有兩個卵黃（原）蛋白，其分子量分別約為 48 與 51 kDa，經過鹽析法、離子交換法及凝膠過濾法能夠達到純化果實蠅卵黃蛋白的效果，而以純化過之卵黃蛋白所製備之抗體對於卵黃（原）蛋白具有專一性結合，至於應用製備得之抗體探討激素調控東方果實蠅卵黃形成作用之機制則目前正在進行中。

致 謝

本研究承蒙行政院國家科學委員會 NSC 89-2313-B-005-017 計畫經費補助，特致謝忱。研究期間國立中興大學昆蟲學系昆蟲生態研究室劉玉章教授與行政院農委會動植物防疫檢疫局台中分局提供試驗用蟲源，國立中興大學畜產學系李淵白教授應允提供製備抗體之雞隻，以及鄭朵智博士提供技術指導，亦謹此致謝。

參考文獻

- Bownes, M., and M. Blair.** 1986. The effects of a sugar diet and hormones on the expression of the *Drosophila* yolk-protein genes. *J. Insect Physiol.* 32: 493-501.
- Brennan, M. D., A. J. Weiner, T. J. Goralski, and A. P. Mahowald.** 1982. The follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 89: 225-236.
- Chiu, H.-T.** 1978. Studies on the improvement of mass rearing for Oriental fruit flies. *Plant Prot. Bull.* 20: 87-92 (in Chinese).
- Engelmann, F.** 1979. Insect vitellogenin: identification, biosynthesis and role in vitellogenesis. *Adv. Insect Physiol.* 14: 49-108.
- Hagedorn, H. H., and J. G. Kunkel.** 1979. Vitellogenin and vitellin in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 24: 475-505.
- Handler, A. M., and P. D. Shirk.** 1988. Identification and analysis of the major yolk polypeptide from the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* (Loew). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 9: 91-106.
- Harnish, D. G., and B. N. White.** 1982. Insect vitellins: identification, purification, and characterization from eight orders. *J. Exp. Zool.* 220: 1-10.
- Izumi, S., K. Yano, Y. Yamamoto, and S. Y. Takahashi.** 1994. Yolk proteins from insect eggs: structure, biosynthesis and programmed degradation during embryogenesis. *J. Insect Physiol.* 40: 735-746.
- Kunkel, J. G., and J. H. Nordin.** 1985. Yolk proteins. pp. 83-111. *In: Kerkut, G. A., and L. I. Gilbert, eds. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Vol. 8.* Pergamon Press, Oxford, UK.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly

- of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Levedakou, E. N., and C. E. Sekeris.** 1987. Isolation and characterization of vitellin from the fruitfly, *Dacus oleae*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 4: 297-311.
- Raikhel, A. S., and T. S. Dhadialla.** 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 217-251.
- Rina, M. D., and A. C. Mintzas.** 1987. Two vitellins-vitellogenins of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*: a comparative biochemical and immunological study. *Comp. Biochem. Physiol.* 86B: 801-808.
- Trougakos, I. P., K. Lamnissou, and L. H. Margaritis.** 1999. Biochemical and immunocytochemical analysis of vitellogenesis in the olive fruit fly *Dacus (Bactrocera) oleae* (Diptera: Tephritidae). *Cell Biol. Intl.* 23: 417-429.
- Venugopal, K. J., and D. Kumar.** 1999. Vitellins and vitellogenins of *Dysdercus koenigii* (Heteroptera: Pyrrhocoridae) - identification, purification and temporal pattern. *Comp. Biochem. Physiol.* 124B: 215-223.
- Zongza, V., and G. J. Dimitriadis.** 1988. Vitellogenesis in the insect *Dacus oleae*. Isolation and characterization of yolk protein mRNA. *Insect Biochem.* 18: 651-660.

收件日期：2002年11月20日

接受日期：2003年6月9日

Purification, Characterization, and Antibody Preparation of Vitellins of the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae)

Hsiao-Ling Lu and Kuang-Hui Lu* Department of Entomology, National Chung-Hsing University, 250 KuoKuang Road, Taichung, 402 Taiwan, ROC

ABSTRACT

The Oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis* (Hendel)) has two vitellins (Vns), with estimated molecular weights of 48 and 51 kDa, respectively. Vns were sequentially purified from the eggs of *B. dorsalis* by salting out, ion exchange chromatography, and gel filtration chromatography. By salting out the egg homogenate, SDS-PAGE analysis revealed that the Vns were mainly precipitated in a 50~70% ammonium sulfate solution. The salted-out proteins were further purified by ion exchange chromatography, and the result showed that Vns were mainly eluted with a 0.3~0.5 M sodium chloride gradient. Finally, the elutes of ion exchange chromatography were refined by running them through gel filtration chromatography to obtain purified Vns. SDS-PAGE separated the 48- and 51-kDa purified Vns, and used them as antigens to raise polyclonal antibodies. After obtaining the antibodies, Western blotting detection of the Vns and vitellogenins (Vgs) in the hemolymph of 8-day-old male and female *B. dorsalis* and eggs showed that the antibodies were specific to Vns/Vgs; however, there were cross-reactivities between the 48- and 51-kDa Vns/Vgs.

Key words: Oriental fruit fly, vitellin, vitellogenin, polyclonal antibody