

该通路上的工作点及与其他基因的作用,还需在后续工作中进行研究。而且 WEB2 参与检查点控制机制的功能区也有待测定,以确定其与 Bragulia 等发表的 DNA2 解链酶活性区的相互作用关系<sup>[1]</sup>。

由于 WEB2 蛋白与人染色体 10q21.3 - 22.1 区编码产物 Dna2L(Dna2 helicase like)蛋白高度同源<sup>[9]</sup>,458 个氨基酸中 41% 相同。而本研究发现 WEB2 基因突变,可导致酿酒酵母 S 期检查点缺陷,细胞异常分裂。此外,Budd 还报道 WEB2 蛋白可能还具有 DNA 依赖的 ATP 酶活性及核酸酶活性<sup>[10]</sup>。因此,研究 WEB2 基因在酿酒酵母 S 期检查点调控中的作用,可以推知人类 Dna2L 蛋白的酶活性,从而加深对真核细胞检查点调控的了解,有利于揭示人类基因功能失调所导致的细胞异常增殖的原因,为探索肿瘤的发生提供依据。

### 摘 要

WEB2 基因编码产物为一种 DNA 解链酶。WEB2 突变株经 hydroxyurea 阻断 DNA 合成后,经流式细胞仪检测 DNA 含量、纺锤体微管间接免疫

荧光染色及存活率测定,结果显示 WEB2 突变株表现 S 期检查点缺失。推测 WEB2 除了具有解链酶作用外,还参与酿酒酵母 S 期检查点调控机制,位于已建立的 S 期检查点信号传导通路模型上。本研究有助于加深对真核细胞检查点调控的了解,为研究肿瘤的发生机制提供线索。

关键词:WEB2 基因 S 期检查点 酿酒酵母

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Bragulia D et al.,1998,*J Mol Biol*,**281**(4):631 - 649.
- [ 2 ] Elledge SJ,1996,*Science*,**274**:1664 - 1672.
- [ 3 ] 刘子铎译,2000,《酵母遗传学方法实验指南》,科学出版社,100 - 101.
- [ 4 ] Elledge SJ et al.,1995,*Cell*,**80**:29 - 39.
- [ 5 ] Sanyovanale D et al.,1998,*Science*,**395**:615 - 618.
- [ 6 ] Sherr CJ,1996,*Science*,**274**:1672 - 1677.
- [ 7 ] Fiorentino DF et al.,1997,*Mol Biol Cell*,**8**:2519 - 2537.
- [ 8 ] King RW et al.,1996,*Science*,**274**:1652 - 1659.
- [ 9 ] Eki T et al.,1996,*Genomics*,**37**(3):408 - 410.
- [ 10 ] Bud ME et al.,2000,*J Biol Chem*,**275**(22):16518 - 16529.

## A ROLE OF WEB2 GENE IN S PHASE CHECKPOINT REGULATION OF *S. CEREVISIAE*

LI Xin Ming SUN Li Guang XUAN Zhong Xin SONG Jin Dan  
(Department of pathogenic biology China Medical university, Shenyang 110001)

### ABSTRACT

WEB2 gene encodes a DNA helicase. A WEB2 mutant was treated with Hydroxyurea. Facs analysis, spindle microtubule staining by indirect immunofluorescence and % survial indicate that the mutant is defect in S phase checkpoint. We propose that WEB2 has not only helicase activity, but a role in S phase checkpoint regulation. And WEB2 gene locates in S phase checkpoint signal transduction pathway in *S. cerevisiae*. The study should shed light on eukaryotic cell checkpoint regulation and the origin of cancer.

Key words: WEB2 gene S phase checkpoint *S. cerevisiae*

## 一种中红侧沟茧蜂畸形细胞分泌的寄生特异蛋白\*

秦启联 丁翠葵 和李馨 崔力

(中国科学院动物研究所农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室 北京 100080)

畸形细胞(teratocytes)是指某些内寄生蜂的卵在孵化时,包裹胚胎的浆膜层细胞同孵化的幼蜂一起掉落在寄主的血腔中,分散而成的单个细胞<sup>[1]</sup>。这种细胞不仅生长迅速,而且存在于幼蜂整个的寄生过程,协调着寄主的生理状态,使之利于寄生蜂的

本文 2001 年 1 月 18 日收到,6 月 7 日接受。

\* 国家自然科学基金项目(批准号:3987009 和 30000017)和农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室开放课题(课题号:9912)

致谢:文内照片由本所买国庆先生拍摄并冲洗,谨表谢意。

生长发育<sup>[1-3]</sup>。中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 是一种寄主范围非常广泛的内寄生蜂,它的寄主涉及到鳞翅目夜蛾科和尺蛾科的40多种昆虫<sup>[4]</sup>,其中包括棉铃虫 *Helicoverpa amigera*、黏虫 *Pseudaletia separata*、甘蓝夜蛾 *Barathra brassicae* 等农业上的重大害虫。作为一种害虫生物控制因子,在田间,特别是在棉田,中红侧沟茧蜂起了极其重要的作用<sup>[5]</sup>。同时,中红侧沟茧蜂是一种具有畸形细胞的内寄生蜂<sup>[2,3]</sup>,以此作为实验昆虫,不仅有利于利用寄生蜂进行生物防治的生产实践,而且能够研究畸形细胞作用于寄主的分子机理。本文通过研究中红侧沟茧蜂的寄生生理,发现了一个98.6kDa的寄生特异蛋白,并初步证明是由畸形细胞分泌的,为进一步研究畸形细胞调节寄主的生理生化因子作了铺垫工作。

## 材料与方 法

### 1. 昆虫的饲养

黏虫、棉铃虫和小地老虎 *Agrotis ypsilon* 分别用相应的人工饲料,在  $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$  的光照培养箱,光 16h + 暗 8h 的光周期下饲养。中红侧沟茧蜂成蜂交配后,喂以 10% 的蜜糖水,在室温或  $4^\circ\text{C}$  下,黑暗中保存。

### 2. 寄生

用 3 龄末期处于皮层溶离 (apolysis) 时期的黏虫、棉铃虫和小地老虎幼虫作寄主,让交配后的雌蜂在寄主上产入两粒卵,确保每个寄主都被寄生,不被产卵的昆虫作相应的对照。寄生后,所有的昆虫都在上述条件下饲养。

### 3. 寄主血淋巴的收集

在寄生后的 1-7 天收集寄主和对照的血淋巴 (7 天后幼蜂钻出寄主)。将昆虫浸入蒸馏水中 10min,使之麻醉。吸水纸吸干虫体,解剖针刺破第一对腹足之一,用毛细管收集血淋巴,加少量苯基硫脲防止血淋巴黑化,在  $4^\circ\text{C}$ , 5000rpm (TGL-16B 高速台式离心机,上海安亭科学仪器厂)

下离心 3min,上清于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中保存备用。

### 4. 畸形细胞的收集和体外培养

让雌蜂在 3 龄黏虫上产出 1 粒卵,取受寄后 4-7 天的黏虫收集畸形细胞 (相应地,畸形细胞为 3-6 日龄)。无菌条件下,用 75% 的乙醇对黏虫表面消毒后将之浸入蒸馏水中 10min 麻醉。在 Sf900 昆虫细胞培养液 (Gibco 公司) 中用尖嘴镊小心撕破黏虫的头壳和体壁,充分漂洗,使畸形细胞完全脱离寄主,落入培养液中。用毛细管吸取畸形细胞,在 Sf900 中清洗 5-10 次后,2-3 个胚胎量的畸形细胞放入含有  $20-40 \mu\text{l}$  Sf900 培养液的凹玻片内。凹玻片上加盖玻片,用液体石蜡封固,在  $28^\circ\text{C}$  全暗条件下培养。解剖出的幼蜂用尖嘴镊小心挑出清洗后,单独培养或同畸形细胞共培养。收集培养不同时间的培养液,保存于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中备用。

### 5. SDS-PAGE 电泳

采用 4% 的浓缩胶,12%、7.5% SDS-PAGE 和 5% - 20% SDS-PAGE 连续梯度三种分离胶进行电泳,考马斯亮蓝 R-250 染色 (参考 Bio-Rad 公司 Mini-Protein II 电泳槽说明书)。电泳槽和电泳仪分别是 Bio-Rad 公司的 Mini-Protein II 和 Model 3000Xi。梯度胶以 150V 的恒压,其他胶以 30mA 的恒流进行电泳。样品加 2-3 倍的样品缓冲液,在  $100^\circ\text{C}$  下煮沸 4 min 后上样,标准分子量蛋白质购自 Promega 公司。

## 结 果

### 1. 寄生特异蛋白

黏虫受寄生后,血淋巴蛋白的质和量都有很大变化,特别是在寄生的 5-7 天,出现一个 98.6kDa 的寄生特异蛋白 (p98.6) (图 1 中 9,10,11 泳道)。

为了验证不同的寄主受中红侧沟茧蜂寄生后,血淋巴中同样出现 p98.6,选用另外两种中红侧沟茧蜂的寄主棉铃虫和小地老虎,分别受寄后血淋巴蛋白的电泳谱带,结果见图 2 和图 3。

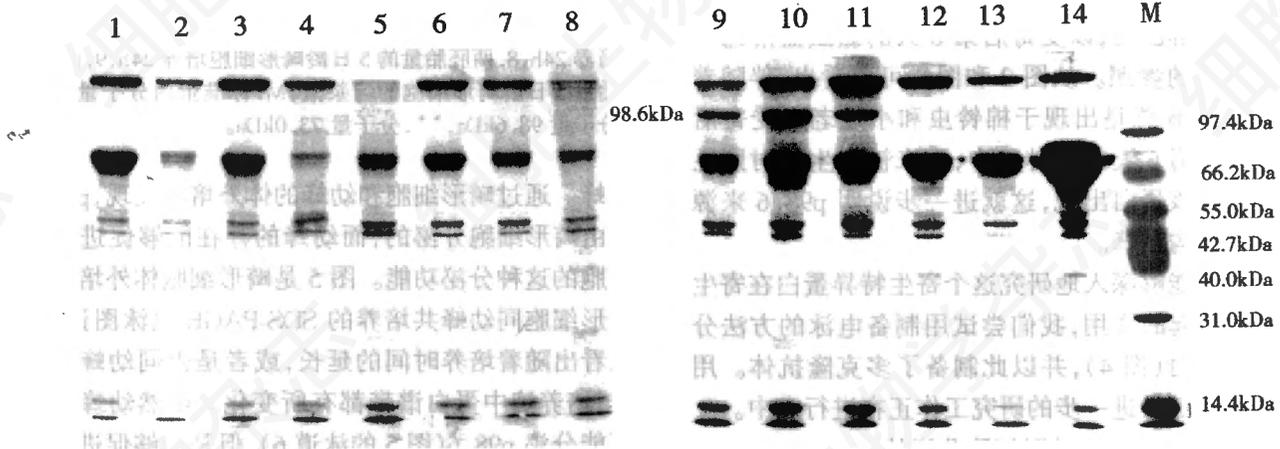


图 1 3 龄末黏虫受寄后血淋巴蛋白 SDS-PAGE (12% 分离胶) 电泳图谱  
1-4,9-11 泳道分别是受寄后 1-7 天黏虫血淋巴;5-8,12-14 分别是相应的未寄生对照;M 是标准蛋白分子量。

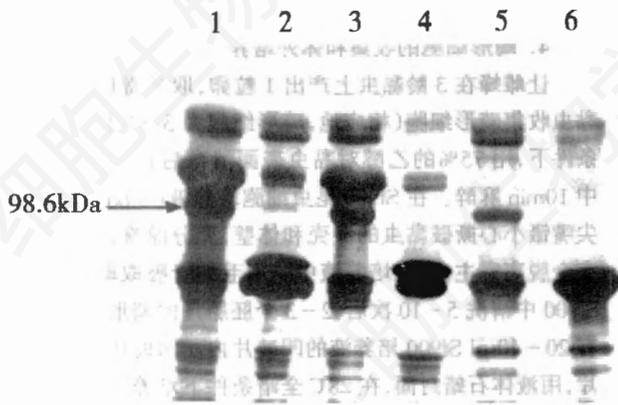


图2 3龄末的棉铃虫和黏虫受寄后血淋巴 SDS-PAGE (5% - 20% 梯度胶) 电泳图谱  
 1. 棉铃虫受寄后 5 天, 2. 1 的未受寄的对照; 3. 棉铃虫受寄后 6 天, 4. 3 的未受寄对照; 5. 黏虫受寄后 6 天, 6. 5 的未受寄对照。

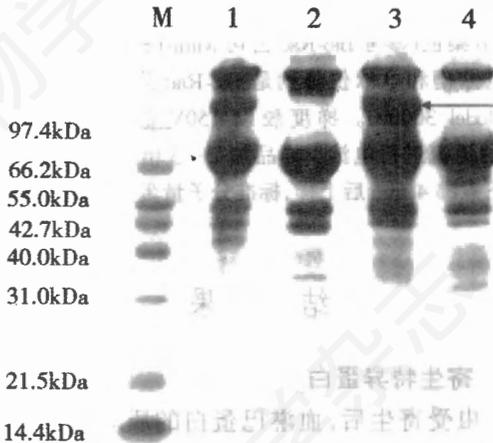


图3 3龄末的小地老虎和黏虫受寄后血淋巴 SDS-PAGE (7.5% 分离胶) 电泳图谱  
 1. 小地老虎受寄后 6 天, 2. 1 的未受寄的对照; 3. 黏虫受寄后 6 天, 4. 3 的未受寄的对照; M. 标准蛋白分子量。

由于黏虫在受寄后的第 6 天, 血淋巴中 p98.6 表达量最多(图 1), 因而在分析受寄的棉铃虫和小地老虎血淋巴时, 以受寄后第 6 天的黏虫血淋巴作为 p98.6 的参照。从图 2 和图 3 可以看出, 伴随着寄生, p98.6 总是出现于棉铃虫和小地老虎受寄后第 5 天或第 6 天的血淋巴中, 而未被寄生的对照昆虫并没有该蛋白出现, 这就进一步说明 p98.6 来源于中红侧沟茧蜂。

为了能够深入地研究这个寄生特异蛋白在寄生过程中所起的作用, 我们尝试用制备电泳的方法分离了该蛋白(图 4), 并以此制备了多克隆抗体。用多抗作为工具进一步的研究工作正在进行之中。

2. P98.6 是由畸形细胞分泌的

P98.6 可能有两个来源: 来自畸形细胞和来自

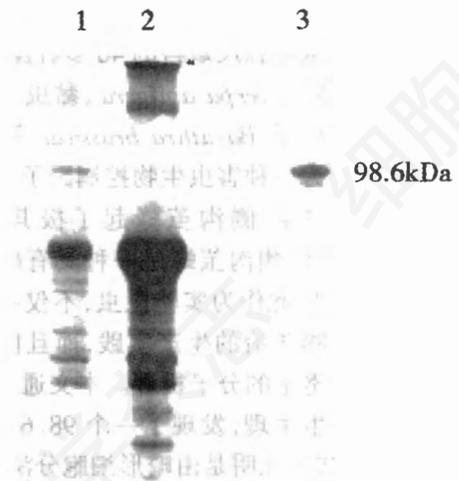


图4 由制备电泳分离的 98.6kDa 寄生特异蛋白(7.5% 分离胶)  
 1. 受寄后 6 天的黏虫血淋巴蛋白; 2. 1 的未寄生对照 3. 分离的 98.6kDa 寄生特异蛋白。

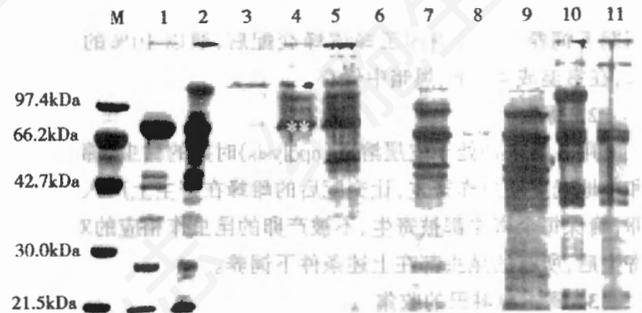


图5 畸形细胞体和幼蜂外培养培养液的 SDS-PAGE 分析(12% 分离胶)  
 2 和 10. 受寄后 6 天粘虫血淋巴, 1 和 11. 对照粘虫血淋巴, 3. 3 日龄畸形细胞培养 12h, 4. 3 日龄畸形细胞培养 48h, 5. 3 日龄畸形细胞培养 72h, 6. 两头 5 日龄幼蜂培养 24h, 7. 两胚胎量的 5 日龄畸形细胞和两头 5 日龄幼蜂共培养 24h, 8. 两胚胎量的 5 日龄畸形细胞培养 24h, 9. 两胚胎量 5 日龄畸形细胞的匀浆液, M. 标准蛋白分子量, \* . 分子量 98.6kDa, \*\* . 分子量 73.0kDa。

幼蜂。通过畸形细胞和幼蜂的体外培养发现, p98.6 是由畸形细胞分泌的, 而幼蜂的存在能够促进畸形细胞的这种分泌功能。图 5 是畸形细胞体外培养或畸形细胞同幼蜂共培养的 SDS-PAGE 电泳图谱, 可以看出随着培养时间的延长, 或者是否同幼蜂共培养, 培养液中蛋白谱带都有所变化。虽然幼蜂自身不能分泌 p98.6(图 5 的泳道 6), 但是能够促进畸形细胞的分泌功能(比较图 5 的泳道 7 和 8)。另外,

畸形细胞在体外还能分泌一个 73.0kDa 的蛋白(见图 5),在受寄寄主的血淋巴中也大量出现,对这个蛋白和 p98.6 生理意义的研究正在进行之中。

## 讨 论

畸形细胞是一类地位十分特殊的细胞,它起源于寄生蜂的浆膜细胞,属寄生蜂物质,但又生长于寄主的血淋巴中,在寄生蜂的寄生过程中扮演着非常重要的作用<sup>[1]</sup>。目前有许多畸形细胞结构和功能的报道,其中对其结构的认识,通过扫描电镜和透射电镜等手段,了解比较清楚<sup>[2,6]</sup>,但对畸形细胞的功能,还没有十分确切的说法。然而有一点是非常肯定的,即畸形细胞通过分泌蛋白质或多肽物质,发挥其生理作用。Schepers 等<sup>[7]</sup>体外培养红足侧沟茧蜂 *M. croceipes* 的畸形细胞发现,用非变性 PAGE 电泳能够区别出培养液中 15 个 24-347kDa 的蛋白质,并且初步认定 30 kDa 以下的蛋白组分具有抑制寄主脂肪体合成保幼激素酯酶的功能。但到目前为止,还没有见到已经分离出畸形细胞分泌的蛋白的报道。本研究从寄主血淋巴蛋白分析入手,初步证明了寄主血淋巴中一个 98.6kDa 的寄生特异蛋白是畸形细胞分泌的,并分离出这个蛋白,为畸形细胞功能的研究奠定了基础。

幼蜂的存在可以促进畸形细胞分泌蛋白的功能是个有趣的现象(图 5)。Strand 等<sup>[8]</sup>和 Greany 等<sup>[9]</sup>在寄生蜂体外培养时发现畸形细胞同幼蜂之间存在一种互利的关系,作者在研究畸形细胞的其他实验中也发现,幼蜂的存在能延长畸形细胞在体外存活的时间,增强其分泌的功能<sup>[10]</sup>。这些结果都

暗示了畸形细胞在寄生蜂和寄主的关系中发挥着重要的作用。

## 摘 要

SDS-PAGE 电泳表明,黏虫 *Pseudaletia separata*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、小地老虎 *Agrotis ypsilon* 的幼虫受中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 寄生后,血淋巴中都出现一个 98.6 kDa 的寄生特异蛋白(p98.6)。畸形细胞(teratocytes)的体外培养发现,p98.6 是由来自中红侧沟茧蜂胚胎浆膜层的畸形细胞分泌的。这一结果将为研究寄生蜂的寄生理和畸形细胞在协调寄生蜂和寄主关系中的作用打下基础。

关键词:中红侧沟茧蜂 畸形细胞 蛋白质 细胞培养  
黏虫 棉铃虫 小地老虎

## 参 考 文 献

- [1] 秦启联等,1999,昆虫学报,42:431-438.
- [2] 秦启联等,2000,昆虫学报,43:282-285.
- [3] 秦启联等,1999,应用与环境生物学报,5:374-377.
- [4] Asgari, S., et al., 1994, *J. Insect Physiol.*, 40:789-795.
- [5] 王德安等,1984,昆虫天敌,6:211-218.
- [6] Pennacchio, F., et al., 1994, *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 23:93-104.
- [7] Schepers, E.J., et al., 1998, *J. Insect Physiol.*, 44:767-777.
- [8] Strand, M.R., et al., 1988, *Entomol. Exp. Appl.*, 46:71-81.
- [9] Greany, P.D., 1989, *Southwest Entomol. Suppl.*, 12:89-94.
- [10] Qin, Q.L., et al., 2000, *J. Int. Path.*, 76:79-80.

## A PARASITIC SPECIFIC PROTEIN SECRETED BY TERATOCYTES FROM EMBRYO OF PARASITOID WASP MICROPLITIS MEDIATOR (HYMENOPTERA: BRACONIDAE)

QIN Qi Lian DING Cui GONG He LI Xin CUI Li

(State Key Laboratory of Integrated Management of Insects & Rodents,  
Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

### ABSTRACT

SDS-PAGE analysis showed that a 98.6kDa(p98.6) parasitic specific protein was appeared in the hemolymph of three noctuid larvae *Pseudaletia separata*, *Helicoverpa armigera* and *Agrotis ypsilon* after the larvae parasitized by parasitoid wasp *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae) respectively. In vitro culture of teratocytes, the cells derived from serosal membrane of the wasp's embryo, indicated that the protein was secreted by them. The result will enhance the researches of teratocytes in mediating relationship between parasitoid wasp and its host.

Key words: *Microplitis mediator* Teratocytes Protein Cell culture *Pseudaletia separata* *Helicoverpa armigera* *Agrotis ypsilon*