



结合反相高效液相色谱和酶联免疫吸附法测定昆虫血淋巴中的蜕皮甾醇激素*

叶 滨^{1,2**} 李 康² 李 胜^{2***} 李 恺^{1***}

(1. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200241; 2. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘 要 【目的】昆虫体内的蜕皮酮和 20 羟基蜕皮酮 (20E) 是两种主要的蜕皮甾醇激素, 其中蜕皮酮是 20E 的前体, 而 20E 是有活性的蜕皮甾醇激素。本研究旨在建立一种测定昆虫血淋巴中蜕皮激素高效、稳定、准确的方法。【方法】采集家蚕血淋巴, 抽提总蜕皮甾醇激素, 利用反相高效液相色谱法 (反相 HPLC) 分离并收集蜕皮酮与 20E, 进而利用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定家蚕血淋巴的总蜕皮甾醇激素、蜕皮酮和 20E 各自的滴度。【结果】计算出总蜕皮甾醇激素中蜕皮酮与 20E 的比例, 推算出蜕皮酮合成和分泌、以及蜕皮酮转化为 20E 的能力。【结论】该方法高效、稳定、准确, 可广泛应用于昆虫蜕皮甾醇激素滴度的测定。

关键词 家蚕, 蜕皮甾醇激素, 蜕皮酮, 20 羟基蜕皮酮, 反相 HPLC, 酶联免疫吸附法

Detection of ecdysteroids in insect hemolymph by a combination of reverse-phase high-performance liquid chromatography and an enzyme linked immunosorbent assay

YE Bin^{1,2**} LI Kang² LI Sheng^{2***} LI Kai^{1***}

(1. School of Life Science, East China of Normal University, Shanghai 200241, China; 2. Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract [Objectives] To develop a highly efficient, stable, and accurate, method for the determination of two main ecdysteroids in insect hemolymph, namely ecdysone and 20-hydroxyecdysone (20E). Ecdysone is the immediate precursor of 20E, while 20E is the activated form of insect ecdysteroids, or molting hormones. [Methods] Ecdysone and 20E collected in *Bombyx* hemolymph were separated by reverse-phase, high-performance, liquid chromatography (RHPLC), followed by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), to determine their respective titers. [Results] The ecdysone and 20E titer in *Bombyx* hemolymph was determined, and the relative ratio of ecdysone to 20E obtained. The biosynthesis and secretion rates of ecdysone, as well as the conversion rate of ecdysone to 20E, were calculated. [Conclusion] The new method is highly efficient, stable, and accurate, and can be conveniently applied to determine the titers of ecdysteroids in insects.

Key words *Bombyx*, hemolymph, ecdysteroid, ecdysone, 20-hydroxyecdysone, RHPLC, ELISA

蜕皮甾醇激素 (Ecdysteroids) 是一类昆虫体内普遍存在的甾醇激素, 最初由 Butenandt 和 Karlson (1954) 在家蚕中提取得到。昆虫在幼

虫阶段, 由前胸腺合成并分泌蜕皮酮 (Ecdysone) 到血淋巴中, 再经血淋巴运送到各个组织, 在蜕皮酮 20-羟化酶催化下蜕皮酮转化成 20 羟基蜕皮

* 资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (31125025 to LS)

**第一作者 First author, E-mail: yebin360@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: lisheng01@sibs.ac.cn; kaili@admin.ecnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-10-16, 接受日期 Accepted: 2016-01-14

酮(20-hydroxyecdysone, 20E) (Marchal *et al.*, 2010; Wang and Li, 2012)。20E 是有活性的蜕皮甾醇激素, 即通常所说的蜕皮激素。

蜕皮激素在昆虫生理活动中发挥多种作用。首先, 20E 的主要作用是诱导蜕皮 (Riddiford *et al.*, 2003)。20E 通过其受体复合体 EcR-USP 促进气门腺 Inka 细胞合成蜕壳启动激素 (Ecdysis-triggering hormone, ETH), 也同时抑制 ETH 的分泌, 对 ETH 进行双重调控作用, 精确调控整个蜕皮过程 (郭恩恩等, 2008)。其次, 配体-受体复合物 20E-EcR-USP 启动 Br-C、E74、E75 和 E93 等 20E 初级应答基因的表达式; 这些初级应答基因然后触发天冬氨酸凋亡酶编码基因 Dronc 和 Drice, 死亡激活因子基因 reaper 和 hid, 以及细胞自噬基因等 20E 次级应答基因的表达, 最终导致昆虫变态过程中幼虫组织的细胞凋亡和自噬 (李康等, 2011; Tian *et al.*, 2013)。此外, 在成虫阶段, 20E-EcR-USP 可以调控卵黄原蛋白的合成进而调控昆虫的生殖发育 (Montell, 2001; Dubrovsky, 2005)。因此, 干扰害虫体内蜕皮甾醇激素合成可成为一种重要的害虫防治手段 (Dhadialla *et al.*, 1998; Smaggheet *et al.*, 2010)。建立一种高效、稳定、准确测定昆虫血淋巴中蜕皮甾醇激素含量的方法, 可为害虫的生物防治提供理论基础与研究技术; 同时, 也可用于其他物种甾醇激素含量测定提供借鉴。

目前, 蜕皮激素含量测定主要采用有机溶剂萃取组织中的总甾醇类物质, 进而用放射免疫法 (Tanaka, 1995; Takaki and Sakurai, 2003; Li *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015) 或酶联免疫吸附法 (Pascual *et al.*, 1995; Friesen and Kaufman, 2004; Margam *et al.*, 2006) 测定蜕皮甾醇激素的滴度。这种分离方法较粗犷, 提取液中干扰众多, 测出的蜕皮激素滴度为蜕皮酮与 20E 等的总和, 无法确定其各自滴度。HPLC 是目前分离已知和未知甾醇激素物质的主要方法和手段 (Lachaise *et al.*, 1989; Sonobe *et al.*, 2006; Yamazaki *et al.*, 2011)。前期研究发现反相 HPLC 可以很好地分离血淋巴中的蜕皮酮与 20E (Marchal

et al., 2012), 因而我们采用反相 HPLC 结合酶联免疫吸附法测定蜕皮酮与 20E 各自的滴度, 并对此新技术的可行性和操作性、以及潜在意义进行了讨论。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂、器材

实验用的家蚕 *Bombyx mori* 品系为 P50, 由中国农业科学院镇江蚕业研究所提供。ELISA 测定蜕皮甾醇激素滴度相关试剂购自美国 Cayman Chemical 公司, 分别有 EIA buffer (No. 400060)、20-Hydroxyecdysone AChE Tracer (No. 482200)、20-Hydroxyecdysone EIA Antiserum (No. 482202)、Wash Buffer (400 ×) (No. 400062)、Ellman's Reagent (No. 400050)、Precoated (Mouse Anti-Rabbit IgG) EIA 96-Well Strip Plate (No. 400005)。蜕皮酮 (E) 与 20E 标准品购自上海浩然生物技术有限公司, 生产商为 Alexis 公司; 超纯水购自上海生工公司, 高效液相色谱仪为 Agilent 公司 1100 series。

1.2 血淋巴中的蜕皮甾醇激素提取

取 950 μL 家蚕血淋巴, 与甲醇 1:1 混合, 15 000 g 离心 10 min; 取上清, 冰上重悬 30 min, 15 000 g 离心 10 min; 取上清, 70°C 金属浴烘干后用 200 μL 溶解液 (800 水: 200 乙腈: 1 三氟乙酸) 溶解。溶解后的液体用 0.22 μm 滤膜过滤以去除不溶物, 滤液可置于 -80°C 备用。

1.3 高效液相色谱分离蜕皮酮和 20E

配制 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的蜕皮酮 (E)、20E 及 E+20E 混合物标准品各 50 μL 。按程序 (0 min, 20% ACE, 80% Water; 5.00 min, 20% ACE, 80% Water; 25.00 min, 35% ACE, 65% Water), (1.000 mL/min, 240 nm) 对 E+20E 的标准品混合液进行反相 HPLC 色谱层析, 如图 1 所示。再分别对 E 与 20E 标准品单独色谱层析, 可知前峰为 20E, 后峰为蜕皮酮。根据反相 HPLC 色谱图分离的 E 和 20E 的保留时间不同, 设定 20E 的收样时间为 6.7~8.7 min, E 的收样时间为 13.0~15.0 min。馏

分经 70℃金属浴烘干后,溶于 EIA 缓冲液进一步测定 E 与 20E 的滴度。

1.4 ELISA 测定方法

配制标准品,初始浓度为 100 ng/mL,1:2 稀释 7 次,设置 8 个浓度梯度点制作标准曲线。如图 2 所示,加 100 μ L EIA 溶液到 NSB (Non-specific binding), 50 μ L EIA 到 B₀ (Maximum binding)。在 2、3、4 列 S (Standard) 孔中加入 50 μ L 标准品,从第 5 列开始加入 50 μ L 相应样品。除 Blk (Blank) 与 TA (Total activity) 之外,在其他所有孔中加入 50 μ L Tracer,再在除 Blk、TA 及 NSB 之外在其他孔中加入 50 μ L Antiserum,4℃孵育过夜。Wash buffer 每孔洗 5 次。在所有孔中加入 200 μ L Ellman's Reagent,在 TA 孔额外再加入 5 μ L Tracer,室温孵育 90~120 min。在 405 nm 处检测每孔的吸光度。

1.5 数据统计与分析

计算 NSB 与 B₀ 吸光度平均值,B₀ 平均值减去 NSB 平均值得到修正 B₀ 值;将各孔吸光度减去 NSB 均值得到吸光度修正值,将各孔吸光度修正值除以 B₀ 再乘以 100 得到 %B/B₀,即 %B/B₀ = 100 × (B - NSB^{avg}) / (B₀^{avg} - NSB^{avg})。以标准品浓度为纵坐标,%B/B₀ 为横坐标作图,得到标准曲线公式。将各孔 %B/B₀ 代入公式即可获得样品中蜕皮甾醇激素的浓度。其中 Blank 与 TA 分别为阴性对照与阳性对照。每个组样品设置 3 个生物学重

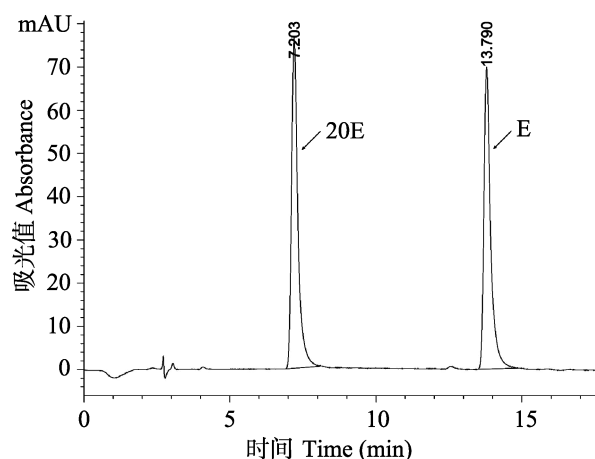


图 1 蜕皮酮和 20E 的高效液相色谱图谱分离图

Fig. 1 Standard ecdysone and 20E separated by RHPLC

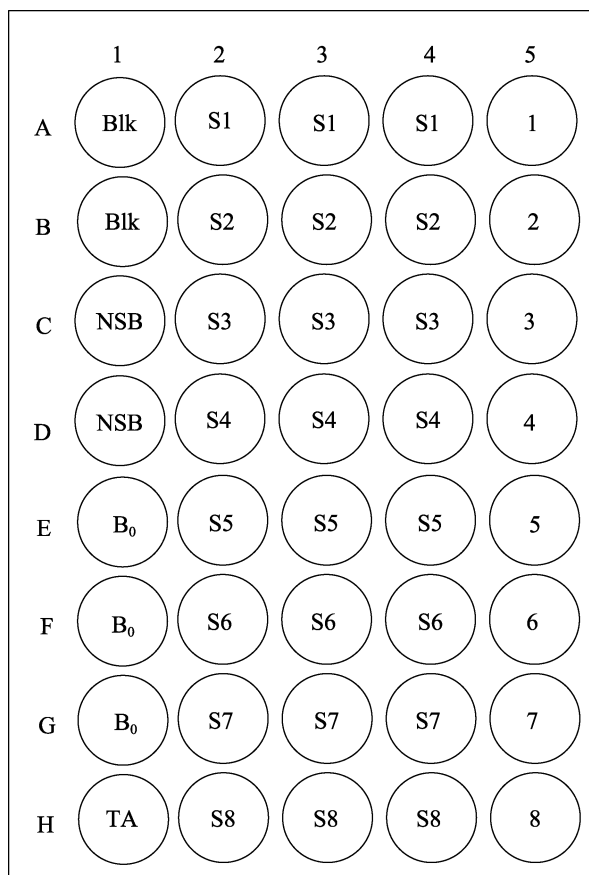


图 2 平板结构

Fig. 2 ELISA plate format

复,计算平均值及标准误差。

2 结果与分析

2.1 血淋巴总蜕皮甾醇激素的 ELISA 测定

首先,用 ELISA 测定未经 HPLC 分离的依次递增体积的家蚕血淋巴提取物中总蜕皮甾醇激素的含量,并计算出蜕皮甾醇激素含量与血淋巴体积的相关性。如图 3 所示(标准曲线选用 20E,后文展示),以预蛹 1 d (PP1) 的家蚕血淋巴为例,蜕皮甾醇激素含量与血淋巴体积呈现出很好的线性关系,说明该测定方法的稳定性和准确性。同时,分别测定 5 龄 2 d (5L2D) 和预蛹 2 d (PP2) 的总蜕皮甾醇激素滴度,发现家蚕总蜕皮甾醇激素在 PP2 时的浓度显著高于 5L2D,约为 86.4 倍。

2.2 蜕皮酮与 20E 的 HPLC 分离与 ELISA 测定

家蚕血淋巴总蜕皮甾醇激素提取物经 HPLC

分离、收取馏分后, 进一步利用 ELISA 法测定蜕皮酮和 20E 的滴度。如图 4、图 5 所示, 在家蚕预蛹期 (PP2) 无论是蜕皮酮还是 20E 的滴度都远远高于喂食期 (5L2D), PP2 的蜕皮酮和 20E 滴度分别约为 5L2D 的 59.7 倍和 105.4 倍。结果表明前胸腺中蜕皮酮的合成和分泌能力在 PP2 比 5L2D 要高许多。

2.3 蜕皮酮与 20E 的相对比例

通过计算发现, 在 5L2D 和 PP2 时期血淋巴内蜕皮酮与 20E 在比例上也出现很大差别, 如图 6 所示, 在喂食期家蚕 20E 与蜕皮酮的相对比例

约为 2.9 : 1, 而在幼虫-蛹转变时期 (PP2), 家蚕血淋巴内 20E 与蜕皮酮的相对比例约为 5.1 : 1。综合图 5 和图 6 的结果, 推算出在周边组织中转化已有蜕皮酮为 20E 的能力在 PP2 比 5L2D 要高近一倍。

3 讨论

利用反相 HPLC 分离结合酶联免疫吸附法可以广泛测定昆虫血淋巴中蜕皮酮和 20E 的滴度变化。在具体操作过程中, 由于在喂食期间蜕皮甾醇激素滴度较低, 所以采集昆虫血淋巴的采集量需要较大, 建议至少采集 1 mL 左右。在甲

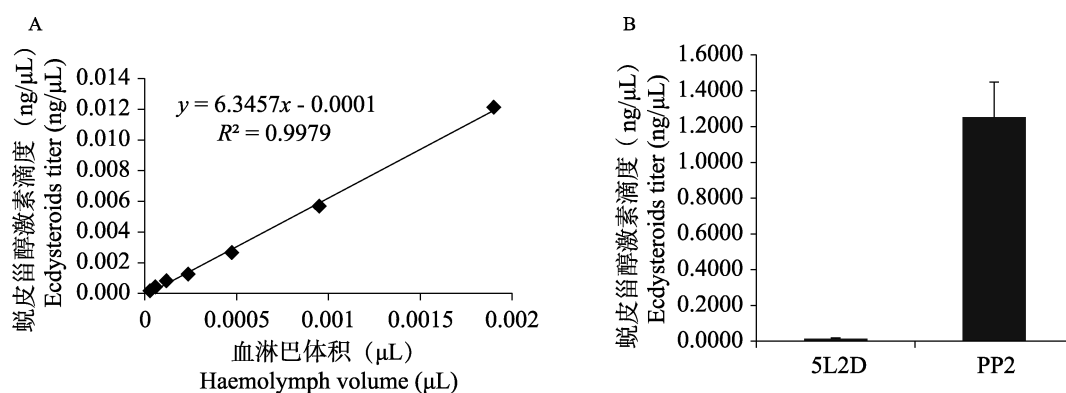


图 3 PP1 血淋巴体积与蜕皮甾醇激素滴度相关性图及 5L2D、PP2 时期蜕皮激素浓度
Fig. 3 The linear relationship between hemolymph volume and total ecdysteroid titers, and the total ecdysteroids titers on 5L2D and PP2

A. 血淋巴体积与蜕皮甾醇激素滴度相关性图; B. 5L2D 和 PP2 时期蜕皮激素浓度。

5L2D、PP1 和 PP2 分别为 5 龄 2 d、预蛹 1 d 和预蛹 2 d。下同。

A. The linear relationship between hemolymph volume and total ecdysteroid titers;

B. The total ecdysteroids titers on 5L2D and PP2. 5L2D, PP1 and PP2 are day 2 of the 5th instar, day 1 of the prepupal stage and day 2 of the prepupal stage. The same below.

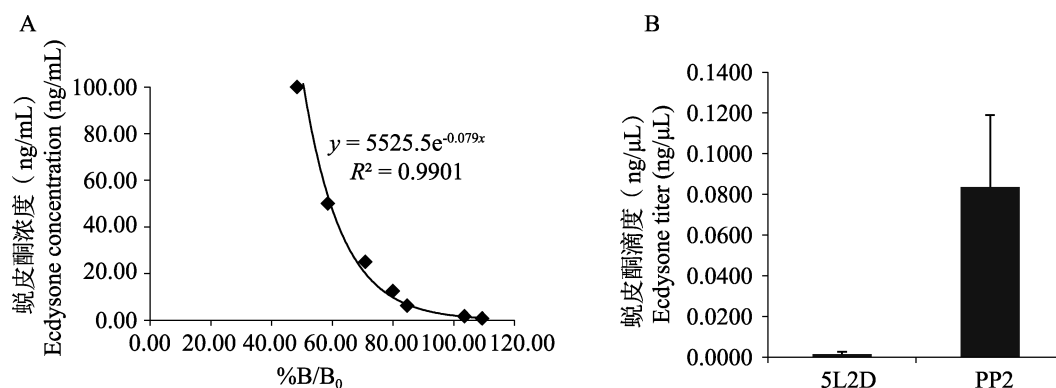


图 4 蜕皮酮标准曲线及其浓度测定

Fig. 4 Standard curve of ecdysone and its titer in hemolymph of 5L2D and PP2 larvae

A. 蜕皮酮标准曲线; B. 5L2D 和 PP2 时期蜕皮酮浓度。

A. Standard curve of ecdysone; B. Ecdysone titer in hemolymph of 5L2D and PP2 larvae.

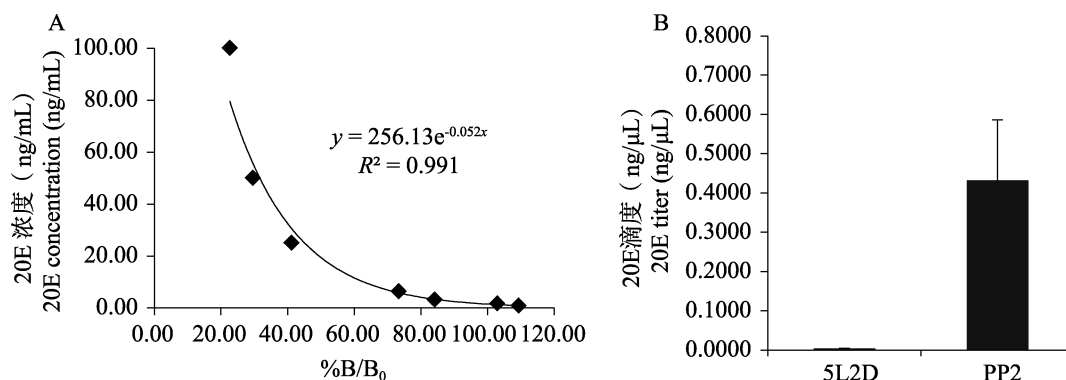


图 5 20E 标准曲线及其浓度测定

Fig. 5 Standard curve of 20E and its titer in hemolymph of 5L2D and PP2 larvae

A. 20E 标准曲线；B. 5L2D 和 PP2 时期 20E 浓度。

A. Standard curve of 20E; B. 20E titer in hemolymph of 5L2D and PP2 larvae.

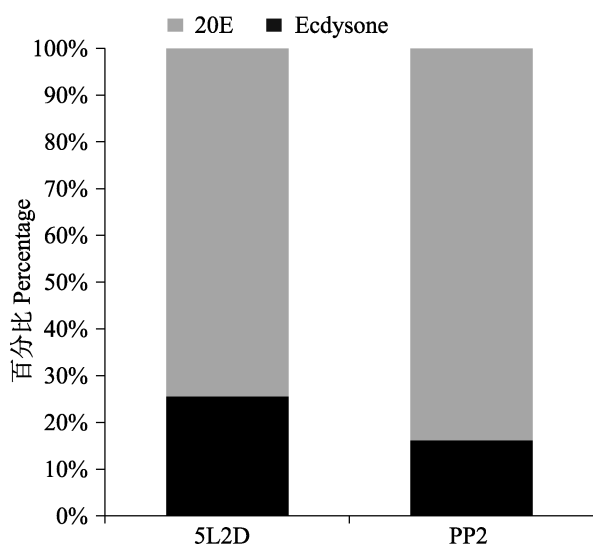


图 6 5 龄 2 d 及预蛹 2 d 蜕皮酮与 20E 的相对比例

Fig. 6 The relative ratio between ecdysone and 20E in hemolymph on 5L2D and PP2

醇提取蜕皮甾醇激素过程中, 单次离心会有蛋白沉淀不完全的情况发生, 可多次冰上重悬再离心以去除血淋巴中蛋白。HPLC 标样出峰时间跨度不到 1 min, 但由于样品的浓度一般都低于标样浓度以及其他杂质的存在, 会导致出峰时间前移或后移, 故收取馏分时间应向前后扩至 2 min 最为稳妥。ELISA 实验过程中, 预计蜕皮甾醇激素浓度较高的样品可稀释至少 100 倍之后再进行测定。此外, 在洗孔过程中, 人为操作造成一定误差, 所以可将 3 次重复增加到 4 个重复以增加实验准确性。最后, 需要注意的是实验用水都需要是超纯水。样品制备时, 实验者应考虑到不同

季节同一种昆虫生活环境不同, 血淋巴中蜕皮甾醇激素的滴度也会略有差异。综上所述, 本研究的方法总体技术流程为获取组织材料, 有机溶剂提取总甾醇类物质, 采用 HPLC 以标准品为参考分离并收集总甾醇类物质中的蜕皮酮和 20E, 最后采用 ELISA 测定蜕皮酮和 20E 滴度。

本研究中可以看出, 在取食期蜕皮酮与 20E 都维持在一个很低的水平; 然而在变态过程中, 蜕皮酮与 20E 都提高到很高水平, 特别是 20E 与蜕皮酮的比例从 2.9 : 1 提高到 5.1 : 1。蜕皮甾醇激素是昆虫变态发育中的重要激素, 尤其是其活性形式 20E 可诱导整个蜕皮过程, 以及变态时期幼虫组织中细胞凋亡和细胞自噬的发生, 致使幼虫的组织消亡并为成虫组织的发生提供营养物质再利用 (Riddiford *et al.*, 2003)。蜕皮酮与 20E 在昆虫血淋巴内同时存在, 二者滴度水平以及它们之间的转化效率还能间接的反应蜕皮酮在转化为 20E 的过程中的关键酶蜕皮酮 20-羟化酶 (如 Halloween 基因 Shade) 的活性 (Petryk *et al.*, 2003)。

本研究的目的是建立一种高效、稳定、准确的方法以测定昆虫血淋巴中总蜕皮甾醇激素, 以及单独的蜕皮酮和 20E 滴度。本研究建立的方法还可用于测定前胸腺中蜕皮酮的合成和分泌、周边组织中蜕皮酮转化为 20E 的能力, 以及用于测定其它节肢动物中蜕皮甾醇激素的滴度。该方法高效、稳定、准确, 可为害虫的生物防治提供理论基础与研究技术, 还可为其他物种甾醇激素含

量测定提供借鉴。

参考文献(References)

- Butenandt A, Karlson P, 1954. Über die isolierung eines metamorphosehormons der insekten in kristallisierter form. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 9(6): 389–391.
- Dubrovsky EB, 2005. Hormonal cross talk in insect development. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 16(1): 6–11.
- Dhadialla TS, Carlson GR, Le DP, 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual Review of Entomology*, 43(1): 545–569.
- Friesen K, Kaufman WR, 2004. Effects of 20-hydroxyecdysone and other hormones on egg development, and identification of a vitellin-binding protein in the ovary of the tick, *Amblyomma hebraeum*. *Journal of Insect Physiology*, 50(6): 519–529.
- Guo EE, Li S, Cao Y, 2008. The hormonal regulation network of insect molting. *Canye Kexue*, 34 (2): 370–374. [郭恩恩, 李胜, 曹阳, 2008. 昆虫蜕皮的激素调控网络. 蚕业科学, 34 (2): 370–374.]
- Lachaise F, Carpentier G, Sommé G, Colardeau J, Beydon P, 1989. Ecdysteroid synthesis by crab y-organs. *The Journal of Experimental Zoology*, 252(3): 283–292.
- Li K, Guo EE, Mukhtadir SH, Li QR, Cao Y, Tian L, Deng XJ, Li S, 2015. *Bombyx* E75 isoforms display stage-and tissue-specific responses to 20-hydroxyecdysone. *Scientific Report*, 5: 12114.
- Li K, Li S, Cao Y, 2011. Transcriptional regulation by 20-hydroxyecdysone and its nuclear receptor EcR-USP. *Acta Entomologica Sinica*, 54(8): 933–937. [李康, 李胜, 曹阳, 2011. 蜕皮激素与其受体 EcR-USP 的转录调控机制. 昆虫学报, 54(8): 933–937.]
- Liu X, Dai FY, Guo EE, Li K, Ma L, Tian L, Cao Y, Zhang GZ, Subba RP, Li S, 2015. 20-Hydroxyecdysone (20E) primary response gene *E93* modulates 20E signaling to promote *Bombyx* larval-pupal metamorphosis. *Journal of Biological Chemistry*, 290(45): 27370–27383.
- Marchal E, Vandersmissen HP, Badisco L, Van de Velde S, Verlinden H, Iga M, Van Wielendaele P, Huybrechts R, Simonet G, Smaghe G, Vanden Broeck J, 2010. Control of ecdysteroidogenesis in prothoracic glands of insects: A review. *Pepetides*, 31(3): 506–519.
- Marchal E, Verlinden H, Badisco L, Van Wielendaele P, Vanden Broeck J, 2012. RNAi-mediated knockdown of shade negatively affects ecdysone-20-hydroxylation in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology*, 58(7): 890–896.
- Margam VM, Gelman DB, Palli SR, 2006. Ecdysteroid titers and developmental expression of ecdysteroid-regulated genes during metamorphosis of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Physiology*, 52(6): 558–568.
- Montell DJ, 2001. Command and control: regulatory pathways controlling invasive behavior of the border cells. *Mechanisms of Development*, 105(1/2): 19–25.
- Pascual N, Belles X, Delbecque JP, Hua YJ, Koolman J, 1995. Quantification of ecdysteroids by immunoassay: comparison of enzyme immunoassay and radioimmunoassay. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 50(11/12): 862–867.
- Petryk A, Warren JT, Marqués G, Jarcho MP, Gilbert LI, Kahler J, Parvy JP, Li Y, Dauphin-Villemant C, O'Connor MB, 2003. Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *PNAS*, 100(24): 13773–13778.
- Riddiford LM, Hiruma K, Zhou X, Nelson CA, 2003. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(12): 1327–1338.
- Satake S, Kaya M, Sakurai S, 1998. Haemolymph ecdysteroid titer and ecdysteroid-dependent developmental events in the last-larval stadium of the silkworm, *Bombyx mori*: role of low ecdysteroid titer in larval-pupal metamorphosis and a reappraisal of the head critical period. *Journal of Insect Physiology*, 44(10): 867–881.
- Smaghe G, Gomez LE, Dhadialla TS, 2012. Bisacylhydrazine insecticides for selective pest control. *Advances in Insect Physiology*, 43: 163–249.
- Sonobe H, Ohira T, Ieki K, Maeda S, Ito Y, Ajimura M, Mita K, Matsumoto H, Wilder MN, 2006. Purification, kinetic characterization, and molecular cloning of a novel enzyme, ecdysteroid 22-kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(40): 29513–29524.
- Takaki K, Sakurai S, 2003. Regulation of prothoracic gland ecdysteroidogenic activity leading to pupal metamorphosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(12): 1189–1199.
- Tanaka Y, 1995. The different effects of ecdysone and 20-hydroxyecdysone on the induction of larval ecdysis in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *European Journal of Entomology*, 92(1): 155–160.
- Tian L, Ma L, Guo E, Deng X, Ma S, Xia Q, Cao Y, Li S, 2013. 20-Hydroxyecdysone upregulates Atg genes to induce autophagy in the *Bombyx* fat body. *Autophagy*, 9(8): 1172–1187.
- Wang S, Li S, 2012. Insect ecdysteroids biosynthesis and its regulation by neuropeptides. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(3): 573–577. [王升, 李胜, 2012. 昆虫蜕皮激素生物合成及其神经肽调控. 应用昆虫学报, 49(3): 573–577.]
- Yamazaki Y, Kiuchi M, Takeuchi H, Kubo T, 2011. Ecdysteroid biosynthesis in workers of the European honeybee *Apis mellifera* L. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(5): 283–293.