

浙江大学

博士学位论文



尸食性蝇类的分子鉴别及其发育生物化学特征用于死后间隔时间推断的基础研究

作者姓名 李 凯

指导教师 胡 萃 教授

叶恭银 教授

学科(专业) 农业昆虫与害虫防治

所在学院 农业与生物技术学院

提交日期 二〇〇六年 四月

中文摘要

本文针对当前法医昆虫学中尸食性蝇类的幼期不易鉴别,以及可用于死后间隔时间推断的日龄指标较为缺乏之现状,就尸食性蝇类幼期种类的分子鉴别与其生长发育过程中蛋白质、糖类和脂类以及贮藏蛋白等生化特征的变化进行了系统测定,进而分析这些变化规律用于蝇类日龄推断的可行性,获得下列结果:

1. 杭州地区常见尸食性蝇类的序列分析

通过 DNA 的序列测定,对杭州地区常见的六种尸食性蝇类——巨尾阿丽蝇 *Aldrichina grahami* (Aldrich)、大头金蝇 *Chrysomya megacephala* (Fabricius)、丝光绿蝇 *Lucilia sericata* (Meigen)、棕尾别麻蝇 *Boettcherisca peregrina* (Robineau-Desvoidy)、肥须亚麻蝇 *Parasarcophaga crassipalpis* (Macquart)、家蝇 *Musca domestica* Linnaeus 进行分子鉴定,在六个种类间成功的扩增到了 mt DNA COII 基因的部分序列。DNA 测序结果表明不同种类间的序列差异达到 10%,而同一种类不同个体之间几乎没有差异,差异在 1% 以下。

2. 双向凝胶电泳图谱用于常见尸食性蝇类初孵幼虫的鉴别

双向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。通过对四种常见尸食性蝇类大头金蝇 *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) 初孵幼虫蛋白质组双向凝胶电泳和图象分析,发现各种类间双向电泳图谱差异显著,并对相应的等电点和相对分子量值进行聚类 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电泳图谱有利于鉴别形态学极易混淆的昆虫种类。

3. 巨尾阿丽蝇离食期幼虫肠道内容物的 mt DNA 检测

以猪的 mt DNA 作为靶标,在幼虫体内成功的扩增到了肠道内容物的 DNA,经序列比较与食源完全一致。研究表明, *Cyt b* 基因不仅能在嗉囊中检测到也能从整个虫体中检测到,且前者的 PCR 产物比后者的 PCR 产物更明显。随着巨尾阿丽蝇幼虫消化时间的延长猪 *cyt b* 基因可检测到的概率随之下降。在这里可用改进的 Logistic 曲线方程表示巨尾阿丽蝇幼虫消化食物的时间与能检测到的概率关系模拟为: $y = \exp(a+b*x)/(1+\exp(a+b*x))$ 。(y 表示可检测到的概率, x 表示消化的时间, a、b 两个常数),并给出了不同温度下的模拟方程。

4. 尸食性蝇类幼期蛋白质、脂类、糖含量和体重随发育变化的时间特征

24℃ 下四种不同蝇类幼虫体重随着发育都在 3 日龄达到最大体重,之后随着日龄增加而逐渐降低。蝇类幼虫的体重变化可以用改进的 Logistic 曲线拟合其和日龄的关系。不同种类蝇类体重在蛹期呈不明显的下降趋势,其与日龄的关系可以线性关系拟合。

24℃ 下四种不同蝇类幼虫蛋白质随着发育都在 3 日龄后变化不明显。蝇类幼虫的蛋白质含量变化可以用改进的 Logistic 曲线拟合其和日龄的关系。不同种类蝇类蛋白质含量在蛹期也呈逐渐下降趋势,其与日龄的关系可以线性关系拟合。

24℃ 下不同蝇类幼虫总糖随着发育在 4 日龄后变化不明显。蝇类幼虫的总糖含量变化可以用

改进的 Logistic 曲线拟合其和日龄的关系。不同种类蝇类总糖含量在蛹期也呈逐渐下降趋势，其与日龄的关系可以线性关系拟合。

24℃下不同蝇类幼虫海藻糖随着发育呈现不同的变化趋势，达到最大值的日龄不尽相同。幼虫的海藻糖含量变化可以用改进的 Logistic 曲线拟合其和日龄的关系。不同种类蝇类海藻糖含量在蛹期也呈逐渐下降趋势，其与日龄的关系可以线性关系拟合。

24℃下不同蝇类幼虫脂类含量随着发育在 4 日龄左右到达最大值。蝇类幼虫的脂类含量变化可以用改进的 Logistic 曲线拟合其和日龄的关系。不同种类蝇类脂类含量在蛹期也呈逐渐下降趋势，其与日龄的关系可以线性关系拟合。

5. 温度对尸食性蝇类幼期可溶性蛋白、脂类和可溶性总糖以及体重变化的影响

各温度下，幼虫体重在幼虫期初期随着日龄增加而显著增加，到达幼虫体重的最大值后，在此后各日龄中体重稍下降。但幼虫体重达到最大值的时间随着温度的降低而延长。用改进的 Logistic 曲线对不同种类不同温度下的体重与日龄关系进行拟合。体重在蛹初期显著下降，此后各日龄中体重稍下降，置蛹期末期下降加快。可用线性方程对不同种类不同温度下的体重与日龄关系进行拟合。

各温度下，幼虫蛋白质含量在幼虫期初期随着日龄增加而显著增加，到达幼虫蛋白质含量的最大值后，在此后各日龄中蛋白质含量稍下降。但幼虫蛋白质含量达到最大值的时间随着温度的降低而延长。用改进的 Logistic 曲线对不同种类不同温度下的蛋白质含量与日龄关系进行拟合。各温度下，蛋白质含量在蛹期缓慢下降，可用线性方程对不同种类不同温度下的蛋白质含量与日龄关系进行拟合。

各温度下，幼虫总糖含量在幼虫期初期随着日龄增加而显著增加，到达幼虫总糖含量的最大值后，在此后各日龄中总糖含量稍下降。另外，随着温度的升高，总糖含量的最大值也增加，而且幼虫总糖含量达到最大值的时间随着温度的升高而缩短。用改进的 Logistic 曲线对不同种类不同温度下的总糖含量与日龄关系进行拟合。各温度下，总糖含量在蛹初期显著下降，此后各日龄中总糖含量稍下降，到蛹期末期下降加快。用线性方程对不同种类不同温度下的总糖含量与日龄关系进行拟合。

各温度下，幼虫脂类含量在幼虫期初期随着日龄增加而显著增加，到达幼虫脂类含量的最大值后，在此后各日龄中脂类含量稍下降。但幼虫脂类含量达到最大值的时间随着温度的降低而延长。用改进的 Logistic 曲线对不同种类不同温度下的脂类含量与日龄关系进行拟合。各温度下，脂类含量在蛹初期显著下降，此后各日龄中脂类含量稍下降，置蛹期末期下降加快。用线性方程对不同种类不同温度下的脂类含量与日龄关系进行拟合。

6. 尸食性蝇类幼虫血淋巴可溶性蛋白组成的时间特征

应用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，分析了 24℃下肥须亚麻蝇与丝光丽蝇幼虫和蛹期血淋巴可溶性蛋白组成的时间动态。结果表明：血淋巴中出现了多条清晰可见的蛋白带，其中在三龄幼虫不同日龄中，a、c、A、F 和 P 带的含量差异较为显著，在各日龄蛹中，a、c、A、F 和 G 带的含

量有一定差异。这些蛋白带在幼虫或者蛹期各日龄间含量的差异具有应用于日龄推断的价值。

7. 肥须亚麻蝇幼虫贮藏蛋白的纯化和多克隆抗体制备

血淋巴经 50~66%(NH₄)₂SO₄ 提纯, 经疏水层析后, 后又经 P-100 凝胶层析对样品进行分子量分级分离, 最后经阴离子交换层析得到纯的贮藏蛋白。已纯化蛋白为抗原, 制备了贮藏蛋白的多克隆抗体, 并纯化了抗血清。

8. ELISA 检测两种麻蝇体内贮藏蛋白含量及温度的变化影响

ELISA 检测表明, 各温度下, 幼虫贮藏蛋白在幼虫期初期随着日龄增加而显著增加, 到达幼虫最大值后, 在此后各日龄中贮藏蛋白含量稍下降。但幼虫贮藏蛋白达到最大值的时间随着温度的降低而延长。可用改进的 Logistic 曲线对不同种类不同温度下的贮藏蛋白含量与日龄关系进行拟合。

各温度下, 幼虫贮藏蛋白含量在蛹初期稍上升至蛹期最大值, 但温度越低所需时间越长。此后各日龄中贮藏蛋白含量稍下降, 至蛹期末期下降加快。可用线性方程对不同种类不同温度下的贮藏蛋白含量与日龄关系进行拟合。

自然温度下饲养的肥须亚麻蝇幼虫和蛹的贮藏蛋白含量检测后, 发现幼虫期比蛹期更适合用来推断日龄。

9. 结论

就法医昆虫学而言, 由于其是一门交叉学科, 在相当程度上依赖于技术的进步。仅目前而言, 笔者认为, 现有的形态学指标和生化指标(包括本文的指标)如何进行综合运用满足现实的需求是当前最重要的。其他更精确的方法有待于其他新技术的成熟, 如生物芯片对于昆虫鉴别, 蛋白质芯片对于日龄推断的应用。

关键词: 肥须亚麻蝇, 棕尾别麻蝇, 丝光绿蝇, 巨尾阿丽蝇, 大头金蝇, 家蝇, 法医昆虫学, 分子检测, mt DNA, COII, 双向电泳, 蛋白质组学, 种类鉴定, 嗉囊, 贮藏蛋白, 蛋白质纯化, 抗体, ELISA, 温度, 蛋白质, 糖类, 海藻糖, 脂类

前言

法医学(forensic medicine)是应用医学、生物学及其他自然科学的理论与技术,研究并解决法律实践中有关医学问题的一门科学。对于广大法医学研究者来说,与各种刑事犯罪作斗争最直接的手段是为刑事案件侦破提供可靠的线索和证据。

在刑事侦查过程中,死亡时间或死后间隔时间(Postmortem interval, PMI)的推测是法医学尸体检查中首先要解决的问题。准确的时间推断对确定案发时间、阐明案件性质、缩小侦查范围,以及根据作案时间认定或排除嫌疑对象等至关重要。

然而,死亡时间的推断一直以来都是法医学研究中的一个重要难题,迄今没有精确的方法。在通常条件下,应用传统的法医学方法,对于死后间隔时间大于3 d的案例,要推断其死亡时间,往往只能靠法医工作者的经验作大致的估计。

20多年来,法医昆虫学因其在死亡时间推断等方面杰出、独到的作用得到了迅速发展,并渐趋成熟(胡萃, 2000; Byrd and Castner, 2001)。其中,尸食性昆虫(首先是蝇类)的生长发育规律,因可用于法医实践中最常见的中短期死后间隔时间的推断,得到了较多研究,但迄今仍有不少问题尚待解决。

尸食性蝇类应用于死后间隔时间推断的研究,主要是依赖于昆虫不同日龄的时间特征性指标。但是由于尸食性蝇类幼虫往往形态比较相似而它们生物学特性则有较大不同,特别是生长发育速率差异甚大(Catts & Haskell, 1990)。故在刑事调查中,利用昆虫的生长发育来推断死后间隔时间(PMI)的第一要点是物种的正确鉴定。因此,一种简便快速的鉴定方法是极为必要的。在已有研究表明,DNA序列分析和蛋白质组学因其技术的常规化,将在法医昆虫学中得到应用。

应用昆虫的生长发育于推断死亡间隔时间时必须考虑到蝇蛆食物来源的问题(Wells, 2001; 李凯, 2003; Camposso *et al.*, 2005),因此食源的鉴定将是今后研究的一个新的方向。

日龄推断,已有的日龄推断方法均是基于幼虫或蛹期形态的变化而建立的,而尸食性蝇类离食期末龄幼虫和早期的蛹发育时间长,形态变化不明显,缺乏有效的日龄指标(Greenberg, 1991; 王江峰, 1999; 胡萃, 2000)。已有研究如对表皮碳氢化合物、尿酸等的研究表明,生物化学特征在尸食性蝇类幼虫和蛹的日龄推断中,具有较大的应用潜力,但是一两个指标容易产生较大误差,因此更多具备时间特征性的生化指标需要寻找。

有鉴于此,本文利用DNA序列分析方法和蛋白质组学技术,建立了鉴别常见尸食

性蝇类的快速方法；根据蝇蛆体内食物的 DNA 序列测定，明确了食物在巨尾阿丽蝇幼虫体内可检测到的时间；通过测定蛋白质含量、糖类含量和脂类含量，探明其在常见尸食性蝇类幼期日龄推断中的应用价值，并明确温度因子对这些生化指标的影响；对两种蝇类幼期血淋巴可溶性蛋白组成的时间特征进行了研究，纯化了肥须亚麻蝇血淋巴贮藏蛋白并制备其抗体用于 ELISA 检测，探明其在常见尸食性蝇类幼期日龄推断中的应用价值，并明确温度因子对这些生化指标的影响等等，以充分发挥尸食性蝇类在死后间隔时间推断中的作用。

第一部分 文献综述

第一章 法医昆虫学研究进展

法医昆虫学是应用昆虫学及其他自然科学的理论与技术,研究并解决司法时间中有关昆虫学问题的一门科学(Keh, 1985; Catts & Goff, 1992; 胡萃, 2000)。它主要利用昆虫学知识对暴力犯罪、意外死亡等作出科学的分析判断,为侦察尸体的死亡时间、死亡地点、死亡原因及其他事实提供真相。

法医昆虫学的历史,最早应追溯到宋代的《洗冤集录》中的“镰刀血腥集蝇”断案的记载(胡萃, 2000; Benecke, 2001)。而近现代法医昆虫学研究则始于 19 世纪后半叶的欧洲,当时 Megnin (1894) 指出了尸体腐败阶段与昆虫区系演替对应的关系,并可用于推断死亡时间,这种思想方法奠定了现代法医昆虫学的基础并一直沿用至今。近百年来,无论是法医昆虫学的基础理论的研究如尸食性蝇类的分类学、生物学、生态学研究,还是法医昆虫的应用研究如法医现场的取样策略、死亡时间推断方法等方面均取得了很大的进展。尤其是近二十年来,法医昆虫学日趋成熟,研究人员遍及各大洲,分子标记、计算机及微量分析等新技术被广泛采用,不少专著相继出版(如 Smith, 1986; Catts 和 Haskell, 1990; 胡萃, 2000; Byrd 和 Castner, 2000),并在法医实践中的应用实际案例日趋增多(Greenberg, 1985; Goff *et al*, 1987; 1992; Hobischak, 1997; Introna, 1998; Benecke, 1998)。

1 尸食性昆虫种类鉴定

种类鉴定是法医昆虫学的基础,在对死亡时间做精确估计之前,必须对尸体上昆虫进行正确鉴定。目前,Byrd & Castner (2000)、胡萃 (2000) 均综述了具法医学意义的昆虫。在法医昆虫中以蝇类最为常见,截至目前,大部分比较重要的麻蝇和丽蝇成虫及老熟幼虫的形态学已得到系统全面的研究。Smith(1986)提供了死亡现场可能遇到的尸食性昆虫的描述及检索表。

由于死亡现场较常见的、且能起死亡时间推断作用的是昆虫幼期,如卵、幼虫、蛹等虫态,而这些虫态的形态学鉴定又颇为困难,因此近几年试图以新技术鉴定昆虫种类的研究甚多。

1.1 电镜技术在法医昆虫学中的应用

以扫描电镜主的电镜技术在尸食性昆虫幼期形态识别、种类鉴定方面已有一定的应用,

并主要用于蝇类幼期的鉴别，详细情况见表 1。

表 1 法医学意义的蝇类幼期超微结构研究

作者年份	报道种类及虫态
Greenberg & Szyska (1984)	铜绿蝇 <i>Phaenicia cuprina</i> 等 15 种丽蝇卵、幼虫及蛹
赵斌和张文忠(1984)	13 种蝇蛹
景涛 (1985)	反吐丽蝇 <i>Calliphora vomitaria</i> 等 7 种丽蝇科幼虫 1、2 龄
张文忠和薛瑞德 (1986)	棕尾别麻蝇 <i>Boettcherisca peregrina</i> 等 2 种麻蝇 1、2 龄
Kang(1988)	丝光绿蝇 <i>Lucilia sericata</i> 等二种蝇
Liu & Greenberg(1989)	酪蝇等 16 种蝇的卵、幼虫及蛹
Greenberg & Singh(1995)	11 种蝇的卵
马玉莹 (1996)	丝光绿蝇 <i>Lucilia sericata</i> 等 5 种蝇 1 至 3 龄
王江峰等 (1999)	丝光绿蝇 <i>Lucilia sericata</i> 等 4 种蝇卵
Wells 等 (1999)	<i>Protophormia terraenovae</i> 等 8 种蝇的 3 龄

研究显示，超微结构的鉴定可受数方面的原因影响：种内及种群内的形态变异；同属内不同种的相似性；不同属种间相似性(Greenberg & Singh, 1995)。

扫描电镜均可用于尸食性昆虫表面超微结构的观察，但由于都须经过烦琐的预处理过程，费时、费力，并且只能观察到局部的放大结构，从而在很大程度上限制了其在法医昆虫鉴定中的推广。上世纪新发展起来的环境扫描电镜(environmental scanning electron microscope)可以实现新鲜昆虫形态的快速观察与鉴别。今后可能在这方面的研究会加强，应用其观察重要尸食性昆虫的形态特征(叶恭银等, 2001)。

1.2 DNA 鉴定

随着分子分析技术的发展，现在一系列围绕着尸食性昆虫幼虫的鉴定方法研究正在开展在法医昆虫学中应用的 DNA 分析技术主要有限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)，DNA 随机扩增多态性 (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)和 DNA 序列分析等。

Sperling 等(1994)利用 RFLP 法鉴别了三种常见的丽蝇科昆虫：伏蝇 *Phormia regina* (Meigen)、丝光绿蝇 *Lucilia sericata* (Meigen)和亮绿蝇 *Lucilia illustris* (Meigen)，测定了 mtDNA 上 2.3kb 长的 DNA 序列，并从 4 种限制性内切酶中找到了一种酶 Hinf I 可以将它们区分开来，Wells 等(1999)的酶切图谱清晰地显示了五个供试种，即壶绿蝇 *Lucilia ampullacea* Villeneuve、叉叶绿蝇 *Lucilia caesar* Linnaeus，亮绿蝇 *Lucilia illustris* (Meigen)、丝光绿蝇 *Lucilia sericata* (Meigen)及红头丽蝇 *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy 的差异。

Benecke 认为，虽然 RAPD 对实验条件的变化高度敏感，但维持某些苛刻的条件，如标准化和精确的步骤能显著改善这一方法，使 RAPD 分型结果的变化最小化，其结果可以精

确的再现。如他在一个案例中于尸体底下发现了蝇蛹，而尸体上则有蝇蛆。由于要根据蝇的发育进度来推断死亡时间，为了明确种类，Benecke 用 RAPD 技术同时分析了尸体底下的蛹和尸体上的幼虫，证实两者不是同一种类，这就为随后的死亡时间推断奠定了基础。Benecke 在实践中将已知种与未知种同时进行分析对比的方法可以消除它的重复性差的问题 (Benecke, 1999)。

DNA 序列分析是通过直接比较不同种类的同源性核酸的核苷酸排列顺序，构建发育树，并推断它们的系统演化关系。此方法是目前分析进化及系统发育研究最有效、最可靠的方法，在法医昆虫的鉴定中也是最可信的。目前研究的比较多的是 mtDNA 和 28s rDNA。其中 CO I (细胞色素氧化酶辅酶 I) 和 CO II (细胞色素氧化酶辅酶 II) 包含了大量的信息，可以把丽蝇鉴定到种的水平。如 Wallman 和 Donnellan(2001)研究了来自南澳大利亚的下列种的 mtDNA 序列: *Calliphora albifrontalis* (Malloch), *Calliphora augur* (Fabricius), *Calliphora dubia* (Macquart), *Calliphora hillihilli* (Patton), *Calliphora maritime* (Norris), *Calliphora stygia* (Fabricius), 红头丽蝇 *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, *Chrysomya rufifacies* (Macquart), *Chrysomya varipes* (Macquart)。他们测定了所有种类的线粒体 CO II 基因的部分序列和 *Calliphora albifrontalis*, *C. augur*, *C. dubia*, *C. stygia* 中的 CO I 序列，并分别根据 CO I 和 CO I + CO II 序列用最大似然法 (Maximum likelihood) 构建了系统发育树。而 Vincent 等(2000)则对来自欧洲的六个种 (见表 1) 的 COI 进行了测序，序列分析表明能够区分这些种。Wells 等 (2001) 对丽蝇科的 mtDNA 进行了测序和系统发育分析，发现 CO I + CO II 序列在尸食性丽蝇的种内差异小于 1%、种间差异大于 3%。这一观察是十分必要的，这样我们才能确信在尸食性蝇类种内序列差异和种间序列差异百分比范围没有重叠，并由此根据 CO I + CO II 序列差异判断两个个体是否同种。

此外，对于科、目等高级阶元的系统发育研究中，通常用进化较慢的 rDNA 片段。Stevens 等(2001)的研究表明 rDNA 的序列测定能在鉴定法医昆虫种类方面发挥作用，他们先测定了 28S rDNA (28S 核糖体 RNA 基因) 中共 2.2kb 长的序列，然后分不同的序列区域进行系统发育分析，结果表明在较短的序列高变区可以区分绝大部分种类，而对整个序列区域的分析则可以识别所有的种类。今后，DNA 序列测定方面应进一步寻找适当进化速率的 DNA 基因或片段，作为鉴定相关种类的标记。

目前，研究最深入的地理种群是夏威夷的丽蝇。Wells 等 (2002) 对夏威夷特有的丽蝇科 *Dyscritomyia* 属进行了分子系统学分析。而 Stevens 等 (2002) 则通过分析 28S rRNA 与 mt DNA 序列，得出了夏威夷 *Lucilia* 绿蝇属的进化关系。

1.3 昆虫表皮碳氢化合物

昆虫表皮碳氢化合物的组成具有一定的物种特异性和地理种群特异性,在昆虫分类中得到了越来越多的应用。研究表明部分昆虫类群,其近缘种在不少情况下很难根据形态学方法鉴别,而根据表皮碳氢化合物可以解决这一矛盾。Byrne 等(1995)对伏蝇 *Phormia regina* 的三个地理种群的成虫表皮碳氢化合物分析表明,可以对其按产地和性别区分。Brown deng (1998) 等研究发现,蛆症金蝇 *Chrysomya bezziana* 不仅可以对种群进行地理区域分组,还可根据表皮碳氢化合物发育阶段的变化推断未知日龄。

2 死亡时间推断

2.1 昆虫区系演替和死亡时间推断的关系

昆虫种类繁多,对环境条件的适应各异,昆虫等节肢动物在一定环境中的尸体上的出现呈现一定的演替,这种演替可以用来推断死亡间隔时间。

自 Megnin(1894)在其研究人尸腐烂阶段和与之相对应节肢动物种类后的近一百多年来,在这方面的研究甚多,涉及了包括人尸之内的诸多种类动物尸体,其中对暴露尸体(Megnin, 1894; Reed, 1958; Payne, 1965; Bornemissza, 1957; Rodriguez *et al.*, 1983; Anderson *et al.*, 1996; 马玉堃 等, 1997;2000)、埋葬尸体(Megnin, 1894; Payne *et al.*, 1968; Vanlaerhoven & Anderson, 1996;1999)、火烧尸体(Avila & Goff, 1998; Introna *et al.*, 1998)、水淹尸体(Payne *et al.*, 1972; Haskell *et al.*, 1989; Vance, *et al.*, 1995;) 上的昆虫区系演替规律作了详细的研究,对悬挂尸体(Goff & Lord, 1994)、包裹尸体(Goff, 1992; Bourel *et al.*, 1995)也有报道。此外季节、光照与遮荫、城市或郊区、房屋内外、场所封闭与否等各种环境因素都影响着尸体腐败和昆虫区系演替规律。其中尤以季节的影响最大(Goddard & Lago, 1985;Introna *et al.*, 1991; Nuorteva, 1959; MacGregor, 1999a; 1999b; Dillon & Anderson, 1995; 1996; Anderson & Peck, 1985; Centeno *et al.*, 2002)。Campobasso 等(2001)对尸体腐败与蝇类滋生的影响因素进行了评述。昆虫区系演替作为一种经典的推断方法,需要搜集大量的资料,满足不通环境条件下都能找到与实验条件相类似的处境,从而进行最正确的判断。

尸体腐败与昆虫区系演替规律的是法医昆虫学中最基础的研究,在实际应用中需要考虑的问题很多,因此这方面研究方能长盛不衰。其中不同季节对蝇类出没的影响较大,成为近几年研究昆虫区系演替的热点,如 Marchenko(2001)、Centeno 等(2002)、Carvalho &

Linhare(2001)。法医工作中的许多案例也表明,昆虫消长的季节性能为侦察提供有力的帮助,如著名的滑雪撬案件(Lord, 2000)就是如此。

2.2 昆虫发育与死亡时间推断

除了昆虫的区系演替规律外,利用昆虫的发育规律进行死亡时间推断也是法医昆虫学的经典方法之一。

迄今为止,许多常见的尸食性蝇类生物学特性已经进行了研究,主要包括温度对发育的影响以及其他具时间特征性的生理生化指标,这些指标将成为昆虫日龄估计的基础数据。

早期的研究主要着重于研究恒温下尸食性蝇类的发育历期,有时还进行建模。上世纪80年代末,人们注意到变温与恒温的差异,发现变温与恒温的平均值相同时,变温下发育慢(Greenberg, 1991),便开始模拟变温研究尸食性蝇类的生长发育(Introna *et al.*, 1989; Byrd & Butler, 1996, 1997, 1998)。有部分学者还关注了从蝇蛆低温保存到送至昆虫学家鉴定这段时间,蝇类发育的变化,它们的结果表明随着低温(4度)保存时间的延长,其发育明显迟缓,从而影响了昆虫日龄的估计(Gaudry *et al.*, 2001; Myskowiak & Doums, 2002)。昆虫是变温动物,因此,根据有效积温有时可以准确的估计昆虫的发育阶段,但是在案发尸体上,可能无法测到精确的尸体表面及内部的温度,而只能根据气温来代替实际温度,因而这方面的工作需要更加细致。

除有效积温法则推断外,部分学者还研究了蝇类的体长在不通温度下的变化情况(Nishida, 1986; Greenberg, 1991; 马玉堃, 1996, 2001; Byrd & Bulter, 1997; 1998; 王江峰等, 1999)及幼虫标本在不同保存液中对体长测量的影响(Tantawi, 1993; 马玉堃)。尸食性蝇类的体重在不同温度下的变化趋势也进行了一定的观察(Williams, 1984; Nishida, 1986; Wells & Lanotto, 1995)。这些结果表明在确定蝇蛆种类的前提下,能够对其发育日龄作出较准确的估计。在法医实际应用中,根据尸食性蝇类的体长和体重来推断比起其他的生理生化或形态指标而言更加实用,但是蝇类在化蛹前,三龄后期有一个体长缩短体重减小的时期,对这一阶段的应用可能需要结合其他的生理生化指标来进行。

除了体长和体重这两个比较重要的日龄标志,还对尸食性蝇类幼期和成虫期的一些时间特征性形态与生理指标进行了研究。如 Greenberg(1991)发现伏蝇蝇蛆喙囊的变化可指示幼虫日龄,并找出了可表征蛹发育时间的11个特征。国内马玉堃等(2001)利用透射电镜技术研究了巨尾阿丽蝇幼虫表皮几丁质片层数量与日龄的关系。王江峰(1999, 2001)根据幼虫与蛹的形态变化特征划分了日龄。这些工作,为实际工作的开展奠定了一定的基础。

2.3 新的用于死亡时间间隔的指示物种的寻找

因为首先出现在尸体上的是丽蝇，迄今推断 PMI 的注意力主要集中在这一类上。然而，还有相当多在法医方面很大研究潜力的尸食性昆虫种类，没有引起人们的关注。举例来说，对于后期到高度腐败的尸体上的甲虫类或酪蝇类，还没有充分研究过其用处。另外，寄生在尸食性昆虫上的昆虫几乎没有被考虑过。它们不同于真正的寄生物，最终会杀死宿主，叫作拟寄生物。宿主的卵，幼虫或蛹常常会被拟寄生物—膜翅目的小蜂总科和姬蜂总科—寄生。其中丽蝇蛹的拟寄生物特别适合于估计 PMI：它们常常在宿主化蛹后不久，就紧接着入侵了。根据它们及其宿主的发育生物学的知识，PMI 可由二者生长发育的时间相加可得。第一个时期是宿主从卵到被寄生为止，第二个时期是拟寄生物从卵发育到成虫。第一次提出 PMI 可根据拟寄生物丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* (膜翅目：金小蜂科) 来推断。当所有初始的取食者（如宿主新陆原伏蝇 *Protophormia terraenovae*）离开尸体后，它的蛹仍然可在尸体上收集到 (Amendt, 2000)。

3 法医昆虫毒理学

法医昆虫毒理学作为法医昆虫学的一个新分支正日益受到法医昆虫学家重视 (Introna, 2001)。它主要利用现代微量分析技术检测与尸体有关的昆虫材料。死亡现场往往隐蔽，尸体常白骨化或高度腐败，已经取不到可检测的组织或组织液，此时昆虫是进行毒理学分析的可靠的样品。法医昆虫毒理学除了能检测由药物引起的死因，还对药物（如吗啡）作用下利用昆虫生长发育规律来推断死后间隔时间提供帮助 (Goff 等, 1994a)。随着，因长期服用毒品而导致死亡的案例越来越多，昆虫在毒理检测方面的诸多优点使人们对利用这一方法的兴趣也日益增加。

此外，鞘翅目昆虫有时也可以作为毒物研究的对象，在含毒尸体上取食的双翅目幼虫取食时毒物随之累积到蛆虫体内，而重金属和其他生物难降解的毒物可以随食物链逐级生物富集，其检测的可能性在取食蛆虫的捕食性甲虫中进行了探讨。

3.1 药物（毒物）检测

在夏威夷瓦胡岛发现一男性腐败尸体，其身旁有马拉松的农药瓶。Gunatilake 等 (1989) 通过气相色谱法检测，在尸体上两种蛆虫大头金蝇 *Chrysomya megacepha* (Fabricius) 和 *Chrysomya rufifacies* (Macquart) 体内测得马拉松的存在，从而证明死者确因有机磷农药中毒。

死亡。在一起怀疑服用安眠药自杀的案件中, Beyer 等(1980)通过气相色谱法和薄层色谱法分析刚开始白骨化尸体上副螺旋蝇 *Cochliomyia macellaria* (Fabricius)体内毒物, 检测到苯巴比妥(Phenbarbital)的存在, 证明死者系服用过量安眠药自杀, 而此时尸体上已没有可供毒理学检测的组织或组织液。

Kintz 等(1990a)从一死亡时间逾 67 天的尸体体内分别采集了胆汁、心脏、肝脏、肺、脾脏、肾脏及蝇类幼虫进行液相色谱分析, 结果几乎在所有材料上都检测到苯二氮类(三唑烷 Triazolam、去甲羟基安定 Oxazepam)、巴比妥类(苯巴比妥 Phenbarbital)、磷酸三环己酮抗抑郁药(Alimemazine、羟甲金霉素 Clomipramine), 再一次证实了利用昆虫进行尸体内毒物情况分析的可能性。在另外一篇文章(Kintz, 1990b)中, 检测了高度腐败尸体的脑部、锁骨和 *Piophil casei* (Linnaeus)虫体的溴吡二氮卓(Bromazepam)和甲氧异丁嗪(Levomepromazine)含量, 并试图在蛆虫体内药剂浓度与尸体组织内药剂浓度之间建立起相应的关系。Wohlenberg 等(1992)通过 GC-MS 在一已基本白骨化的尸体上的蝇蛆和残余肌肉、骸骨、皮肤和头发中发现了那替林(Nortriptyline)。相似的, Goff 等(1993)检测了在注射了不同剂量药剂的兔子上滋生的蝇蛆, 也测到了阿米替林(Amitriptyline)及其代谢物那替林。Miller 等(1994)从一木乃伊化的尸体(已死两年)上的蝇类(蚤蝇科)的蛹壳及甲虫(皮蠹科)的蜕中检测到阿米替林及去甲替林, 并且结果显示蛹壳中的药物浓度比甲虫蜕中的高, 这是因为蚤蝇喜欢取食尸体的软组织, 那里的药物浓度高, 而甲虫则喜食干燥的皮肤。Sadler 等(1997a)检测了阿米替林在 *C. vicina* 体内的累积和消除。食源中分别含相当于人类用于治疗(100 ng/g)、中毒(300 ng/g)、致命(500 ng/g)、10 倍致命的药量。他们发现在高含量药物上生长的蝇蛆体内的药物浓度存在较大的生物差异, 这些差异意味着在利用蝇蛆内药物浓度反推食物源中药物的浓度是不可靠的。幼虫体内的药物浓度难以推测还因为药物有时不止一种或种药物的浓度亦常常不同。他们还发现药物浓度的检测和幼虫表皮的沾染物有一定关系。

吸毒死亡的法医学鉴定正日益受到人们的重视。Nolte 等(1992)从一具死亡达 5 个月、已基本白骨化的尸体上丽蝇幼虫中提取出可卡因及其代谢物苯甲酰爱康宁 Benzoylcegonine (可卡因不稳定易酶解或非酶作用分解), 他同时使用了 GC 和 GC-MS 技术, 结果表明前者在检测肌肉样品时由于组织腐败产物的干扰而无法定量, 但正如 Kintz 等(1990c)指出在类似案例中, 蝇蛆由于没有腐败物的干扰而更适宜作为检测样品。Introna 等(1990)以 40 具死亡原因已知为鸦片(吗啡)中毒的尸体及 10 具非毒物致死的尸体的肝脏为材料饲养红头丽蝇, 发现毒物含量在尸体及蛆虫体内有着近似线性的关系, 结果表明利用昆虫不仅可以

进行毒物类型的判别,也可以进行剂量的测定。在以兔子为蝇蛆滋生对象时,Goff等(1989,1991)研究了兔子上注射各种剂量的可卡因和海洛因时,也得出了类似的结论。这一结论后来还被Kintz(1994)研究一具腐败尸体上的丽蝇幼虫时确认。

虽然有上述研究表明蝇蛆体内和人体内的药物浓度存在显著相关性,但是在其他的研究中并没无法验证,往往只能得出幼虫体内药物浓度远低于人体内药物浓度的结论。如Hedouin等(1999a)发现在预先中毒的兔子组织内的药物浓度是在其上滋生的蝇蛆体内药物浓度30倍到100倍不等。Bourel等(2001c)研究了含吗啡底物上饲养的两种鞘翅目昆虫:*Dermestes frischi* (Dermestidae)和*Thanatophilus sinuatus* (Silphidae)。在*D. frischi*幼虫和蛹中的药物浓度和尸体组织的药物浓度存在相关性。而*T. sinuatus*则只有2龄和3龄的幼虫和组织内药物能建立相关性。Hedouin等(1999a)研究了在含不同浓度吗啡的兔子的蝇蛆,试图在组织和幼虫中药物浓度之间建立相关性。兔子体内的吗啡含量分别为12.5、25.0、50.0 mg/h(毫克/每小时,耳动脉灌注3小时)。另一只作为对照。检测结果表明,在12.5 mg/h的兔子上饲养的蝇蛹中测不到吗啡的存在。此外组织中吗啡的浓度是在幼虫中的30到100倍,并只能在3龄幼虫和组织内浓度间建立相关性。低龄幼虫及蛹和组织间的药物浓度没有相关性。Hedouin等(1999b)建立了吗啡在实验动物兔子血液中的动力学模型。他们的结果表明吗啡在动物模型中的分布是二室模型(two compartment model,又称延滞分布平衡模型),他们随后的实验都是在此基础上进行的,将吗啡从耳动脉以2 mg/kg/h的速度灌注3小时。他们得出不同器官中的浓度不一致,但不同个体的相同器官中的浓度一致。Hedouin等(2001)研究了新陆原伏蝇和红头丽蝇。他们也发现幼虫体内的药物浓度显著低于组织内浓度,从3龄幼虫不取食起到蛹期其体内浓度有一个下降的过程,并建立了3龄幼虫体内药物浓度和组织内浓度的相关性。

在死亡现场高度腐败尸体上最容易找到的是空的蛹壳,当尸体上取食的蝇类羽化飞走后,留下蛹壳,他们最持久,可存留几十年甚至数个世纪,毒物已经在死者头发的蛋白质基质中被检测到,因此他们也极可能在蛹壳的蛋白质基质中存在。Introna(1996)利用空蛹壳进行了毒物学分析的实验,空蛹壳来源于含20种不同吗啡浓度的动物肝脏饲养所得的红头丽蝇。结果表明在所有材料上都可探测到吗啡的存在,吗啡浓度最高的组织(10mg/100g)的分析效果最好。此研究使得在法医案件中把空的蛹壳作为毒物学分析标本成为可能。Bourel等(2001b)利用放射免疫测定法研究了昆虫残骸中吗啡的测定。首先酶解丽蝇蛹壳和干燥成虫以及Dermestidae蛹的表皮提取吗啡(在二硫苏糖醇中用链霉蛋白酶消化2小时),测试进行放射免疫法测定可能的干扰。然后在丝光绿蝇*Lucilia sericata*的蛹壳和干燥成虫中

进行上述测定。丝光绿蝇在含有各种吗啡浓度的鲜肉中饲养。结果表明肉中的浓度从 100~1000mg/kg 时, 在上面饲养的虫的表皮中可以测到吗啡的存在。在 8 具因海洛因过量死的受害者的腰肌饲养的蝇的测定中验证了上述结果。由于尸食性昆虫的蛹壳存在的时间可以很长, 因此在现场没有其他合适的材料时可以作为毒理学分析的材料。Bourel 等 (2001a) 还利用免疫组织化学技术研究了吗啡在反吐丽蝇 *Calliphora vomitoria* 幼虫体内的代谢。幼虫饲以切碎并还有吗啡的牛肉, 通过 avidin-biotin-peroxidase-complex 方法检测。在幼虫的外表皮和内表皮之间发生强烈的免疫反应, 表明吗啡在双翅目幼虫生长发育过程中在表皮层累积。而到了蛹期, 幼虫的表皮转化为蛹壳。故这一研究亦证实, 现场没有合适的组织和活的尸食性昆虫时, 蛹壳可以作为毒理分析的材料。

3.2 药物对双翅目昆虫生长发育的影响

上述是昆虫作为样品来进行毒理学分析以期判断尸体上的毒物。既然检测到蝇蛆上的毒物, 这就表明蝇蛆对毒物的吸收快于排除速率, 但是对于毒物在蝇蛆体内的累积和排除机理并未明白, 包括毒物对幼虫生长发育的影响, 而后者是推断死后间隔时间的关键所在。因此在利用蝇类生长发育状态来推断死后间隔时间必需明确药物或毒素对蝇类生长发育速率影响究竟怎样。

Goff 等 (1989) 利用注射有不同剂量可卡因的家兔尸体饲养麻蝇 *Boettcherisca peregrina*, 发现可卡因及其代谢物 Benzoylcegonine 的存在明显缩短了麻蝇幼虫的发育历期, 其缩短的程度与可卡因含量成正比; 同时证明可卡因对幼虫最大体长、蛹长、蛹重及成虫的产仔量都没有影响。Lord (1990) 记载了昆虫发育加速的案例, 在该谋杀案例中, 三类不同大小的蛆虫被收集到, 其中中型大小的幼虫 (6~9 mm) 表明死后间隔时间为 7 天左右, 小型的幼虫系到达尸体较晚的蝇类所产, 而对一个最大的、发现于鼻腔的蝇蛆 (17.7 mm) 没法解释, 其所标志的死亡时间为 3 周左右, 经过分析此幼虫体内有可卡因存在, 进一步调查表明死者有可卡因服用史, 目击证人证实死者在死亡前曾用鼻子吸食可卡因。显然, 可卡因加速了此幼虫的发育。Goff 等 (1991) 同样研究了海洛因对麻蝇 *B. peregrina* 的影响, 结果表明海洛因同样可以缩短幼虫历期, 与可卡因不同之处在于蛆虫历期缩短的程度与海洛因剂量间没有显著的相关性。此外, 海洛因对蛹的历期则有延长作用。另一点与可卡因不同之处是海洛因对幼虫最大体长, 蛹长具有显著的影响。Goff 等 (1992) 以注射有脱氧麻黄碱 Methamphetamine (中枢兴奋药) 的家兔尸体饲养緋角亚麻蝇 *P. ruficornis*, 发现取食高于致死中量家兔尸体的蛆虫的发育速率明显快于取食死于致死中量的蛆虫, 其最大体长变小 (到达早), 而蛹长之间

却无显著差异, 蛹重则明显低于对照, Goff 等 (1993) 研究了腐败尸体组织中的阿米替林及代谢物那替林对绯角亚麻蝇 *P. ruficornis* 发育速率的影响。结果表明, 幼虫到达最大体长的时间没有显著差异, 但是离食期变长, 所以幼虫及蛹的历期显著延长, 在 26 度可达 77 小时, 这些延长足以改变死后间隔时间的推断。此外, 蛹重和蛹长及幼虫死亡率均高于对照。Goff 等 (1994) 研究了, 苯环己哌啶 (一种兽医用麻醉药和非法致幻剂, 酚噻嗪类) 对绯角亚麻蝇 *P. ruficornis* 的影响, 同阿米替林对绯角亚麻蝇 *P. ruficornis* 发育速率的影响一样均不显著, 但是离食期缩短, 幼虫 (少于对照 3 到 17h) 发育历期被缩短; 蛹同海洛因一样发育历期稍延长。Goff 等 (1997) 注意到 3,4-methylenedioxymethamphetamine(MDMA, 偏亚砷酸 metamphetamine) 对绯角亚麻蝇 *P. ruficornis* 发育速率的影响。LC/MS 分析幼虫和蛹壳, 发现最大体长短于对照, 且达到的时间变短。Bourel 等 (1999) 的研究涉及到吗啡对丝光绿蝇 *Lucilia sericata* 发育的影响。吗啡加速了丝光绿蝇的发育速率, 在死后间隔时间估计时, 若不考虑它的影响, 则会相差 24 小时。因此, 在利用昆虫进行死后间隔时间估计时不能不考虑到药物对昆虫发育速率的影响。Musvasva 等 (2001) 研究了氢化可的松 (Hydrocortisone) 和甲丙烯基甲戊钠 (Sodium methohexital, 巴比妥类) 对麻蝇 *Sarcophaga (Curranella) tibialis* Macquart 发育的影响。结果表明两种药物都能显著延长幼虫期, 而显著缩短蛹期。但无法在药物浓度与幼虫和蛹的历期间 (发育时间) 建立相关性。前一种药物延长了总的发育时间, 后一种药物从卵到成虫羽化的总时间几乎不变。

由 Goff 等人的一系列工作可以看出, 不同毒品在昆虫生长发育方面的影响有着显著的区别。可卡因和海洛因或其代谢物会加速麻蝇 *B. peregrina* 的幼虫发育 (Goff 等, 1989; Goff 等, 1991), 脱氧麻黄碱会加速绯角亚麻蝇 *P. ruficornis* F. (Goff 等, 1992) 的发育, 而 3,4-methylenedioxymethamphetamine(MDMA, Ecstasy) 则延缓了同样种类的发育 (Goff 等, 1997)。这些结果引起 PMI 的错估可达 70 小时 (Goff 等, 1992; Goff 等, 1993)。同理, 在尸体现场若发现蝇的发育模式不寻常, 便有可能是药物作用的缘故。此外, 阿米替林和那替林使幼虫和蛹历期延长 (Goff 等, 1993), 氢化可的松和甲丙烯基甲戊钠 (巴比妥类) 使幼虫期延长、蛹期缩短, 而脱氧麻黄碱 (Goff 等, 1992) 则使幼虫期、蛹期均缩短, 海洛因使幼虫期缩短使蛹期延长 (Goff 等, 1991), 可卡因加速幼虫期但对蛹期无显著影响 (Goff 等, 1989, 1990), 见表 2。

表 2 毒物对蝇类幼期发育历期的影响

毒物种类	对幼虫历期影响	对蛹历期影响
阿米替林和那替林	+	+
氢化可的松	+	-
甲丙烯基甲戊钠	+	-
脱氧麻黄碱	-	-
海洛因	-	+
可卡因	-	~

注：“+”表示历期延长，“-”表示历期缩短，“~”表示没有显著影响。

4 计算机技术

各种环境因素影响昆虫发育,因此要根据自然条件和实验条件数据的对比来推断死亡间隔时间,就不可避免的涉及到大量的运算,计算机技术在法医昆虫学中的应用也因此受到了人们的重视。Williams (1984) 根据尸食性蝇类的体重在不同温度下的变化,编写了可估算孵化时间的程序。Schoenly 等(1992)设计了一个通过对节肢动物演替资料进行分析而推断 PMI 的计算机程序。这些计算机模型在一定程度上减轻了法医昆虫学家的负担,但是在实际工作中,还要进行校正。

5 昆虫体内食物来源的研究

由于 DNA 技术的日益普及,人们开始关注利用 DNA 分子标记来推断尸食性昆虫体内的食物来源,这有助于解决法医调查中一些棘手的问题(Wells 等, 2001)。

James 模拟了奸杀案件中蝇蛆有可能取食精液的情况,对取食了精液的蝇蛆嗉囊进行了 P30ELISA 和 Y-STR (Y-chromosomal short tandem repeats) PCR 分型鉴定,在蝇蛆嗉囊内容物中检测到人类的精液存在。而 Wells 等研究蛆对死亡第一现场确认的作用时,表明蛆的嗉囊适合于作为 DNA 源来鉴定事物来源。Linville 等(2002)还找到了能排除污染血源干扰的蝇蛆表面清洗剂。此外,吸血昆虫的血源鉴定也有利于嫌疑犯的确证,如等对蚊子吸血来源(Coulson, *et al.*, 1990; Kreike, *et al.*, 1999; Chow-Shaffer, *et al.*, 2000)、等对阴虱食源的研究(Lord, *et al.*, 1998; Replogle, *et al.*, 1994)。这些研究结果表明尸食性昆虫血源鉴定是相当有价值的

6 展望

法医昆虫学，这个具有 150 余年历史的学科，随着新技术的应用日趋成熟。两个最近的会议标志着这一具历史意义的时刻。在 1988 年举行的第 14 届国际法医和社会医学学术会议以及第 18 届国际昆虫学大会上，1990 年举行的第 2 届国际双翅学大会和第 12 届国际法医学会议上，以及 1996 年 8 月在意大利佛罗伦萨举行的第 20 届国际昆虫学大会上，都 2000 年 8 月巴西的 21 届国际昆虫学大会中都包含有许多法医昆虫学的论文，开展了法医昆虫学方面的专题讨论。这些大会反映了法医昆虫学已普遍受到法医学界和昆虫学界的重视，可以说法医昆虫学已趋向成熟。

根据近 10 年的法医昆虫研究进展看来，法医昆虫的分子鉴定和法医昆虫毒理学成为研究的两个热点，法医昆虫学通过与新技术的结合，使自身在实践中发挥其快速、准确的作用，从而更易为非昆虫学家所掌握。

第二章 蛋白质组学在昆虫学中的应用

随着人类基因组计划的完成,人们开始了功能基因组的研究,后基因组的时代已经来临。新时代的研究目的是阐明基因组所表达蛋白质的规律和生物功能,这就是蛋白质组研究。20世纪末,蛋白质组(proteome)作为一个细胞或组织的基因组表达的全部蛋白质的概念提出(Wasinger *et al.*, 1995),至今,蛋白质组学(proteomics)已经成为研究生命科学的前沿领域。

目前针对蛋白质组的研究可以概括为两个方面。蛋白质组学一是对组织或细胞基因组编码的所有蛋白质的分离和分析,二是对不同转录条件下蛋白表达变化的分析(Aebersold & Patterson)。前者即蛋白质组表达模式的研究,后者是研究特定时间、特定环境和试验条件下特定组织的蛋白表达,即功能蛋白质组学或称差异蛋白质组学。基因组是静态的,有机体从它产生、发育、衰老直至消亡,它的基因组几乎是固定不变的。但蛋白质组是动态的,有机体的不同组织及发育的不同时期,蛋白质组都是不同的。因此,蛋白质组是一个在空间和时间上动态变化着的整体。

蛋白质组学技术在植物遗传学、药理毒理学、医学等方面已有较多的应用,在昆虫学领域在近年来也逐渐开始有不少的研究。本文结合蛋白质组学研究的关键研究技术双向电泳与生物质谱,简要综述了蛋白质组学在昆虫科学中的应用进展。

1 蛋白组学研究的关键技术平台

双向电泳、高效柱层析、质谱技术和生物信息学对蛋白质组学的产生和发展起了至关重要的作用。液相色谱等分离技术的进展以及生物信息学的兴起是蛋白质组学蓬勃发展的重要因素之一。但蛋白质组学的研究当前主要还是依赖于两大关键技术:基于双向电泳(2-DE)的分离技术及其图象软件分析与以生物质谱为主的鉴定技术及其数据库检索。

1.1 双向电泳

对来自全细胞、组织或生物体中包含成千上万种蛋白质的蛋白混合物的分离是蛋白质组分析的首要要求,必须要有高分辨率的分离办法。基于双向电泳的蛋白质组分析时通过高分辨率的2-DE、分析与比较得到斑点的模式、结合原位蛋白水解和质谱技术鉴定候选蛋白来进行(Gauss *et al.*, 1999)。2-DE模式的检测是通过激光扫描及软件辅助的斑点识别和特征化进行,其染色可用传统的考马斯亮蓝和银染外,还有新的有着更宽的线性定量范围的Sypro荧光染色(Yan *et al.*, 2000)。但是由于低丰度的蛋白极易被高丰度的蛋白所遮掩,因此这一

技术目前仍有待于进一步改进和完善 (Blackstock & Weir, 1999)。

近年来, 多种用于蛋白质组学研究的蛋白质分离分析方法得到了发展, 如基于芯片技术的应用 (Nelson *et al.*, 2000)、蛋白复合物的质谱直接分析 (Link *et al.*, 1999)、亲和标记的使用 (Gygi *et al.*, 1999) 以及大规模酵母杂交筛选系统 (Uetz *et al.*, 2000)。但是, 双向电泳 (2-DE) 出现至今仍是蛋白质分离最有效的方法, 这是由于它在分离上千蛋白质时, 所具有的无可比拟的分离能力, 以及随后的可用计算机定量分析差异表达蛋白质的高灵敏度的染色技术, 还有对 2-DE 胶上用高灵敏度微量化学方法进行鉴定和表征相对比较容易。因而双向电泳仍是目前蛋白质组分离的核心技术。

1.2 生物质谱分析

过去十多年来在离子化的技术及仪器方面取得了突破性的进展如电喷雾电离 (Electrospray Ionization, ESI) (Fenn *et al.*, 1989) 和基质辅助激光吸附/解吸电离 (Matrix-assisted laser Desorption Ionization, MALDI) (Karas and Hillenkamp, 1988), 已成为近年来蛋白质分析技术中最重要的成果。质谱仪的原理是先将样品离子化, 然后根据荷质比来确定样品分子量。对于生物大分子鉴定来说这一技术是高特异性和高速度的检测方法。在经 2-DE 或液相色谱分离后的蛋白, 在胰蛋白酶等特异性酶的作用下分解为肽, 然后就可以用质谱仪分析了。

在质谱仪鉴定蛋白质方面还有一个重要的进展。即是“肽质谱指纹图 (peptide-mass mapping)”, 这主要是 MALDI 质谱仪表现出分析蛋白质酶解后其肽混合物中肽段质量的能力, 尤其是对凝胶分离蛋白质酶切肽段的分析能力, 目前普遍认为 MALDI-TOF 质谱仪进行肽质谱指纹图分析是合适的第一步 (陈主初等, 2002)。

2 在昆虫学研究中的应用

2.1 果蝇蛋白质组研究

作为模式生物, 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 在昆虫的蛋白质组研究方面是一枝独秀。不同性别黑腹果蝇成虫的头、胸、腹部的蛋白质组图谱已被分别作出, 总共约有 1 200 个蛋白质被检出, 其中的大多数在头、胸、腹中是相同的, 但也发现了一部分其部位、性别特异的蛋白质 (Ericsson *et al.*, 1997)。Baggerman 等 (2002) 利用毛细管液相色谱结合质谱和数据库检索, 对黑腹果蝇中枢神经肽进行了分析鉴定。他们从 50 头果蝇幼虫的中枢神经的抽

提液中鉴定到 28 条神经肽。其中 18 条神经肽在数据库已经存在且有基因克隆或基因注释存在；11 条神经肽从未纯化分离过；8 条肽是完全新颖的，共由 5 个不同的未经注释的基因表达而成。果蝇神经肽的表达图谱的研究，为其他已经测定了基因组序列生物的表达分析，提供了借鉴。此外，Vigoreaux 等(2001)认为对果蝇突变株系的飞行肌的蛋白质组分析，对于明确蛋白质在肌原纤维中如何组织和作用的机理十分有利。

除上述外，果蝇血淋巴蛋白质组的数据库也已经建立，其他尚有许多学者开展了或即将进行昆虫内共生菌 *Wolbachia* 在果蝇体内细胞质不亲和性(cytoplasmic incompatibility)的分子机理与 *Wolbachia* 的蛋白质组、果蝇胚胎的神经突触传递、关于雄性与雌性交配行为的基因鉴定、与果蝇繁殖有关的雄性肽酶、果蝇体内部分蛋白质间的相互作用等许多方面的工作（见剑桥大学蛋白质组中心网页 <http://www.bio.cam.ac.uk/proteomics/IGFprojects.html>），可以说果蝇蛋白质组学走在了所有动物蛋白质组研究的最前沿。

2.2 媒介昆虫与病原体蛋白质组研究

采采蝇 *Glossina morsitans morsitans* 是非洲睡眠病的主要媒介昆虫，对它的研究也比较深入。Acosta-Serrano 等(2001)利用 MALDI-TOF 质谱分析技术，分析检测了采采蝇中肠的各种 procyclins (procyclins, 多基因家族表达产物，一类与寄生物锥体虫有关的表达产物)的存在情况。结果表明，采采蝇中肠的 procyclins 呈现规律性表达。Haddow 等(2002)对采采蝇的唾液腺的可溶性蛋白进行了蛋白质组分析。先通过反相高效液相色谱分离不同疏水性蛋白，然后对不同疏水性蛋白进行单向 SDS 电泳，发现有四种含量最多的蛋白并进行 N-端测序；同时对唾液腺的可溶性蛋白进行双向电泳，电泳后用 Q-TOF（四级杆飞行时间质谱分析）和 MALDI-TOF 对相应的肽点进行质谱分析，测序和质谱结果分别在数据库中查找，鉴定了这四种蛋白。Haine 等(2002)报道了采采蝇中肠丰度最高的蛋白是 60KD 的细菌源的分子伴侣 (molecular chaperone)，为了明确在这个重要的媒介昆虫疾病传播中的作用。通过 2-DE 凝胶电泳和质谱分析后，肽质量搜索结果鉴定了这四条信号肽，表明该分子是采采蝇的内共生菌 *Wigglesworthia glossinidia* 的伴侣，而这些分子在非洲锥体虫的生活史中起着举足轻重的作用。

由此，Valenzuela (2002) 认为蛋白质组学与大规模测序、完整 cDNA 文库构建等技术的结合，有利于发现吸血昆虫唾液腺中影响脊椎动物止血、免疫等生理反应并利于传播疾病的各种蛋白因子。

2.3 昆虫表皮蛋白

在昆虫表皮蛋白的研究领域, Missios 等(2000)鉴定了赤拟谷盗 *Tribolium cataneum* (Herbst)的几丁质蛋白。他们通过单相和双向电泳 分析了不同发育阶段(幼虫末龄、蛹期与成虫期)的几丁质蛋白, 找出了他们的相似处与差异。幼虫期、蛹期与成虫期之间双向电泳图谱差异明显, 但在化蛹初期与化蛹后 24 小时的图谱只有稍许差异。Jensen 等(1998)分析了飞蝗 *Locusta migratoria* 表皮的两种主要蛋白。他们对表皮的总蛋白样品进行反相 HPLC 分离, 而后收集蛋白含量最多的几个峰进行双向电泳, 分别用 ESI 质谱分析这两个蛋白在纯化柱里分出来的收集峰的蛋白, MALDI 质谱分析双向电泳图谱中的两种主要蛋白, 对相应的蛋白质进行了鉴定。Andersen 等(2000)从飞蝗和蟑螂 *Blaberus craniifer* 蜕皮后的若虫表皮中抽提到若干蛋白质。纯化后分别得到七种和五种蛋白, 并测定了相应的氨基酸序列。从这些序列中得到了很多信息, 其中飞蝗与蟑螂中各有一种蛋白含有一段 68 个氨基酸残基的序列, 它在其他昆虫种类的表皮蛋白中存在; 而蟑螂中有两种蛋白还含有一段 75 个残基的序列, 它在龙虾和蜘蛛的外骨骼表皮蛋白中存在。 作者认为这些结构在昆虫蜕皮后的几丁质蛋白中起重要作用。

昆虫蛋白质的鉴定是相当困难的, 但是, 作为蛋白质组研究的主要鉴定技术的生物质谱最强大的功能是能够鉴定蛋白质复合物的组成成分(Cagney & Emili, 2002), 生物质谱灵敏度的不断提高显著地促进了对具有生物学功能和应用价值的蛋白质复合体的鉴定, 如上述对昆虫几丁质蛋白的研究以及对其他表皮蛋白的研究 (Chae, 1999; Kaltenhauser, 1995)。

2.4 差异表达

蛋白质组学能够筛选和鉴定不同种类和不同生理状态样品蛋白质组的区别和变化, 着重于寻找有意义的因素引起的 2 个或多个样品直接的差异蛋白质谱, 解释细胞生理和病理转换的进程与本质、对外界环境刺激的反映途径, 以及细胞调控机制, 同时获得对某些关键的差异性蛋白的定性和功能分析。昆虫细胞有各种分化, 每个细胞在它不同功能状态、细胞周期不同时期、接受不同条件因素刺激或药物作用下, 其蛋白质组也会发生相应的变化, 正是这种不同的蛋白质组构成了这一细胞这一时刻的特征性生命活动的基础。

在昆虫细胞间的营养运输已进行了差异表达研究。Cole 等(1997)对卵母细胞与滋养细胞中可溶性蛋白在钒酸盐作用下与对照的双向电泳差异图谱进行了分析, 试图找到 Ca^{2+} 离子转运通道对卵母细胞与滋养细胞之间营养输送的联系, 结果发现了 14 个碱性蛋白和 8 个酸性蛋白出现了差异, 并由此下结论: 离子通道影响了滋养细胞与卵母细胞之间的分子联系。

在诱导昆虫免疫反应方面, Han 等(1999)研究了冈比亚蚊 *Anopheles gambiae* 注射诱导的血淋巴蛋白质的变化。通过对比诱导与对照的双向电泳图谱, 找到了七个有强弱变化的斑点。另外还发现有两个斑点在平行测定中出现多态性, 但只在诱导后出现。

在相同的试验条件下, 不同机体、生命的不同阶段, 不同的组织定位以及在不同的性别中, 蛋白质图谱出现相应的可以相互比较的变化。如在昆虫个体识别方面, 可以发挥其相应的作用。尤其是对同种个体蛋白质图谱中相对稳定的点的鉴定, 甚至可以区分不同的种类。而在昆虫的发育阶段的鉴别方面, 蛋白质组的优势更是突出, 一张图谱就可以有数千个点, 用计算机分析找到发育阶段特异性的点在进行质谱分析, 从而可以作为发育阶段的标志。在昆虫个体识别方面, Papura 等(2002)为了区别携带 BYDV-PAV 病毒的蚜虫高效表达病毒的个体与低表达个体, 利用双向电泳显示了两者的蛋白质组图谱, 在总共 2000 多个蛋白点中, 发现 12 点是在不同表达量个体间的差异点, 而其中 4 个点可以明确区分高表达与低表达个体。在时间差异表达方面, Missios 等(2000)对昆虫不同发育阶段的双向电泳图谱表明, 某些标志蛋白可以区分昆虫的不同发育阶段。

3 前景和展望

综上所述, 当前包括昆虫学在内的生命科学在研究方法上面临着巨大的挑战和机遇, 即如何从结构、功能和生物学过程调控的角度揭示昆虫的行为等表征所含的信息, 运用蛋白质组学研究手段, 通过比较不同生理状态下组织中蛋白质在表达数量, 表达位置和修饰状态上的差异, 可以发现与相关表征对应的蛋白质, 为其机制提供线索。昆虫蛋白质组学研究已初见端倪, 在国外包括果蝇蛋白质组在内的诸多领域都取得了可喜的进展。而国内则由于经费所限, 尚无能力开展这方面系统的研究。但是我们可以根据我们的国情, 尽快就蛋白质组的差异比较方面进行研究, 如寄生蜂毒液与寄主的免疫系统, 不同蝇类或蝇类不同发育阶段蛋白质组图谱, 蛋白质组学的研究可以为此类的问题的解决提供捷径。

今后几年在经典 2DE-MS 方法的基础之上会不断发展出日益多样化的替代或改进技术, 使蛋白质组技术将不仅能全面和系统地完成细胞和组织中各类蛋白质定性和含量分析, 而且能够检测出更多的蛋白质功能状态。特别是随着质谱检测技术的不断提高和分析过程的自动化, 以及生物信息学的快速发展使得大规模检测基因表达的诱导或抑制、鉴定蛋白质复合体并确定细胞的定位和移位以及蛋白质磷酸化等翻译后修饰成为可能。昆虫学各领域对机制的深入研究将会越来越依赖于生物质谱等蛋白质组研究工具。

第三章 昆虫贮藏蛋白

Munn 等(1971)描述了红头丽蝇 *Calliphoria vicina* 幼虫体内大量血清蛋白在蛹期前不久被脂肪体吸收的现象。这类蛋白质累积在稠密的蛋白质颗粒中,故称为贮藏蛋白,这个名称也暗示着它的功能是为成虫的蛋白质合成提供来源。后来,类似的蛋白质在其他双翅目和许多鳞翅目的种类中被发现。Robertts 和 Brock (1981)在一篇简短的评论性文章中提出昆虫贮藏蛋白这一确切的概念。首先这些蛋白质在数量上较少,且仅在幼虫血淋巴中积累、存在;其次,即使不是唯一的,贮藏蛋白也是幼虫脂肪体合成的主要蛋白;第三,其含量在幼虫的高龄,尤其是末龄迅速增长,成虫初期含有微量的贮藏蛋白,但在成虫羽化后几天之内,就不再存在了。

多年以来,得到了较多关于这类蛋白的结构与分布方面的信息。因其高含量的芳香族氨基酸,这些贮藏蛋白又被称为芳香蛋白。芳香蛋白(Aryphorin)是由 80kDa 亚单位组成的六聚体(hexameric)蛋白。在其他的昆虫种类中也发现了这类蛋白,包括半变态类的昆虫。而且,发现他们在结构上与六聚体的蛋白质,即六聚体蛋白(hexamerin)类似,不过却缺乏高含量的芳香族氨基酸。几篇重要的关于六聚体贮藏蛋白的组成、分布和性质的文章发表了(Telfer and Kunkel,1991;Kanost *et al.*,1990;王荫长,2001),这几篇文章里面概括了到1990年为止的有关知识。其后,对贮藏蛋白的结构与功能的研究取得了可喜的进步。这些蛋白质中有几个已被测序,这给研究他们结构上的亲缘关系带来了曙光。另外,发现了在结构上与六聚体贮藏蛋白不相关,但在功能上却与他们相当的蛋白质。在本文第一部分,将讨论不同家族的贮藏蛋白,并将之与其他相关蛋白作比较。这个术语“贮藏蛋白”暗示着它从血淋巴中被吸收并贮存到脂肪体组织中。在那儿,贮藏蛋白就好象贮存池一样,在以后成长过程中需要的时候提供氨基酸来源。不管这些蛋白它们的氨基酸组成与最后的命运如何,被脂肪体吸收是所有真正的贮藏蛋白共同的而且是中心的功能。近年来集中研究了这一过程。

1 贮藏蛋白家族

1.1 概述

在 Telfer 和 Kunkel(1991)的论文里综述了六聚体贮藏蛋白的各种类别。这一部分只在六聚体蛋白的范围内讨论,包括贮藏蛋白但不局限于此。这些蛋白几乎都在双翅目与鳞翅目中

研究, 近来也涉及其他的昆虫种类。所有的双翅目种类都有富含芳香族氨基酸 (>15%) 和甲硫氨酸 (>4%) 的蛋白质。以前这类蛋白有着不同的名称, 如丽蝇蛋白(Munn and Greville, 1969)、幼虫血清蛋白 (LSP-1, Wolf *et al.*, 1977), 现在为了能描述出使人看上去就知道它的功能是芳香族氨基酸的载体, 把它称作芳香蛋白。双翅目中第二类常见的贮藏六聚体蛋白的特点是芳香族氨基酸与甲硫氨酸含量相当低, 果蝇 (Roberts and Brock, 1981) 里的 LSP-2 是一个例子。与之形成对比的是两类常见的鳞翅目贮藏蛋白, 要么富含芳香族氨基酸, 要么富含甲硫氨酸, 而不会两者皆多。重申一下, 这个名字芳香蛋白 *aryphorin* 是对蛋白质中酪氨酸和苯丙氨酸含量>15%的称呼, 而另一类则称“富甲硫氨酸贮藏蛋白”。另外, 六聚体蛋白质在一些鳞翅目种类中已有过叙述, 包括一些存在于粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* (Jones *et al.*, 1990, 1993) 和大蜡螟 *Galleria mellonella* (Mammel *et al.*, 1994) 的保幼激素抑制蛋白 (juvenile hormone-suppressible proteins) 以及核黄素结合蛋白 (riboflavin-binding proteins) (Sihacek *et al.*, 1994; Magee *et al.*, 1990)。

即使所有这些蛋白质有相似的结构单位和幼虫体内的发育过程, 要是它们的吸收、贮存、利用的过程有区别, 那么它们就不一定是“贮藏蛋白”。另一方面, 至少有一个鳞翅目家族拥有一种这样的贮藏蛋白, 它在结构上与六聚体蛋白毫无关系 (Haunerland & Bowers, 1986; Jones *et al.*, 1988; Greenstone *et al.*, 1991); 这种夜蛾 (Noctuids) 的高密度蛋白 (VHDL) 像芳香蛋白一样, 几乎都在幼虫末龄合成, 又迅速被前蛹脂肪体吸收, 贮存在蛋白质颗粒中, 而且不久被水解 (Wang and Haunerland, 1992)。可见, 六聚体结构对于蛋白质的功能是否是贮藏蛋白并不是足够的或者是必要的因素。

在其它昆虫中也发现了贮藏蛋白: 芳香蛋白与其它六聚体蛋白一样在蜜蜂 (Shipman *et al.*, 1987), 蚂蚁 (Wheeler & Martinez, 1995), 甲虫 (Dekort & Koopmanschap, 1994), 也在不完全变态类的蝗科 (Dekort and Koopmanschap, 1987) 和蜚蠊 (Duhamel & Kunkel, 1983; Jamroz *et al.*, 1996) 中描述过。大部分例子中, 贮藏蛋白在发育时利用的过程知道的还很少, 但有迹象表明, 至少芳香蛋白能被所有的全变态种类的蛹脂肪体吸收。另一方面, 非六聚体蛋白在一些鞘翅目 (Coleoptera) 种类中的蛹脂肪体中被发现, 它们也贮存芳香族氨基酸 (Delobel *et al.*, 1992)。

1.2 贮藏蛋白的分类

早期的对贮藏蛋白的分类是依据他们的 AA 组成, 现在已有很多蛋白被测序, 给出了更多可靠的依据。所有的六聚体蛋白显示出与节肢动物的血蓝蛋白 (hemocyanins) 相象, 很

明显它们在进化上是相关的(Willot *et al.*,1989)。血蓝蛋白是含铜的氧合蛋白,在 Chelicerates 和甲壳类中发现。Beintema 等(1994)近来详细分析了这个超家族蛋白,而且根据复合的序列,认为昆虫的六聚体蛋白在进化上来源于常见的血蓝蛋白前体。由于 tracheated 昆虫通常不需要氧气来运输血清蛋白,这个氧合功能就丧失了,这类蛋白也可能在昆虫中生成了不同的功能。在昆虫六聚体蛋白组中比较序列相关性,发现六聚体蛋白形成了 4 类独立的组,称为(1)鳞翅目富苯丙氨酸蛋白(Lepidopteran methionine rich proteins);(2)鳞翅目芳香蛋白(Lepidopteran arylphorin)s;(3)某些鳞翅目 JH 抑制蛋白(certain lepidopteran juvenile hormone-suppressible proteins);(4)双翅目贮藏蛋白(the dipteran storage proteins)。这个组别与不是根据氨基酸的组成来分类,而且它不包括近来已测序的一些蛋白。为了更好的理解上述不同的贮藏蛋白,把功能方面与结构方面结合起来是非常有帮助的。然而,对已报道的序类作直接类比是很困难的,因为测序是采用了不同的方法。为了在论文中比较这些结构,所有当前已知的贮藏蛋白序列都通过 Clustal W 算法进行排列,表 1)。

1.2.1 芳香蛋白

1.2.1.1 双翅目

大量的研究结果说明了双翅目芳香蛋白的生物学功能(Scheller,1983)。这类蛋白质在幼虫倒二龄与末龄的脂肪体中合成,而后分泌到血淋巴,在那儿积累起极高的密度。当昆虫开始漫行(wandering),芳香蛋白的合成就终止了。相反的,这些蛋白质还渐渐的被蛹的脂肪体吸收,在那里贮存在蛋白质颗粒中。虽然对蛋白质的不同区域细节的研究结果还没有出来,已有迹象表明,在脂肪体的背面、尾部有更大量的贮藏蛋白颗粒存在。在预成虫的形成过程中,许多芳香蛋白被部分的破坏,而且它的成分 AA 在新形成的角质层中被发现。

双翅目种类的芳香蛋白已在红头丽蝇中测序(Naumann 和 Scheller,1991)。这类蛋白质独自形成了一种六聚体蛋白(见表 1),但仍显示出与其他所有的六聚体贮藏蛋白有相似的同源性。

1.2.1.2 鳞翅目

鳞翅目芳香蛋白大部分的特征与双翅目的相似,但仍存在一些重要的区别。鳞翅目芳香蛋白有相似的芳香族 AA 百分比,但甲硫氨酸的比例相对较低。在鳞翅目芳香蛋白中的序列一致性在 50%~70%之间,但是,它们与双翅目的同源性则相当小。虽然芳香蛋白

表 1 六聚体超家族的序列相似性。序列同一性和相似性通过 ALIGN 方法进行联配。同

一性在左下方，相似性在右上方。(Haunerland,1996)

Hem: hemocyanin 来自 *Eurypelama californicum*(Genbank 序列 ID 122799);

	Man-A	Bom-A	Gal-A	Man-M	Tri-J1	Bom-M	Tri-J2	Tri-aJ	Gal-82	Lep-A	Bla-A	Cal-A	Pro-2	Hemo
Man-A		90.0	85.5	68.8	68.3	68.3	69.7	69.5	69.4	66.6	64.8	64.4	65.9	63.5
Bom-A	66.6	—	83.3	68.5	66.7	67.7	69.5	68.0	67.1	67.2	63.2	65.4	65.6	61.8
Gal-A	54.2	49.9	—	69.7	67.1	67.1	70.0	66.6	69.2	68.0	63.0	63.8	65.8	62.3
Man-M	31.8	30.3	29.7	—	93.6	87.0	78.1	65.1	64.5	61.0	62.2	66.4	62.5	58.5
Tri-J1	29.0	28.9	27.9	71.2	—	66.2	78.5	67.5	66.0	61.0	59.5	65.2	62.4	59.2
Bom-M	31.4	28.0	30.0	69.5	91.8	—	78.5	65.9	67.0	60.5	60.0	65.2	64.5	58.6
Tri-J2	33.8	32.2	31.7	44.9	44.1	47.5	—	67.8	68.1	63.7	60.5	65.3	63.3	58.6
Tri-aJ	26.7	26.1	27.0	26.0	23.8	25.1	27.1	—	78.4	65.4	64.1	63.6	64.0	62.2
Gal-82	26.2	27.4	28.6	26.2	25.0	25.7	29.5	45.0	—	66.8	63.8	64.2	65.4	62.5
Lep-A	30.5	29.1	31.0	28.5	27.4	28.2	30.4	26.8	28.7	—	67.0	62.6	66.9	63.7
Bla-A	32.3	29.8	30.8	29.3	28.0	29.0	29.2	21.6	22.9	34.9	—	65.0	62.4	63.0
Cal-A	27.8	25.7	29.8	25.3	23.1	27.6	27.5	22.1	25.8	28.6	27.1	—	62.6	56.9
Pro-2	30.5	28.1	28.5	22.5	24.3	24.3	26.3	21.7	25.3	30.7	31.0	31.0	—	60.5
Hemo	24.7	25.1	24.8	23.6	23.7	25.0	27.2	21.6	27.2	26.8	27.4	23.4	26.3	—

注: Man-A: Arylphorin 来自烟草天蛾 *Manduca Sexta*(Genbank 序列 ID 159491);

Bom-A: Arylphorin 来自家蚕 *Bombyx mori* (Genbank 序列 ID134926)

Gal-A: Arylphorin 来自大蜡螟 *Galleria mellonella* (Genbank 序列 ID 449954);

Man-M: methionine-rich protein 来自烟草天蛾 *Manduca Sexta* (Genbank 序列 ID 159526);

Tri-JH1: basic juvenile hormone suppressible protein 1 来自粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* (Genbank 序列 ID 729863);

Bom-M: methionine-rich protein 来自家蚕 *Bombyx mori* (Genbank 序列 ID 134925);

Tri-JH2: basic juvenile hormone suppressible protein2 来自粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* (Genbank 序列 ID 729864);

Tri-aJH: acid juvenile hormone suppressible protein 来自粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* (Genbank 序列 ID 125066);

Gal-82: juvenile hormone suppressible protein 来自大蜡螟 *Galleria mellonella* (Genbank 序列 ID 156154);

Lep-A : Arylphorin 来自西红柿甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (Genbank 序列 ID 556786);

Bla-A : Arylphorin 来自 *Blaberus discoidalis* (Genbank 序列 ID 951139);

Cal-A : Arylphorin 来自红头丽蝇 *Calliphora vicina* (Genbank 序列 ID288282);

Dro-2 : larval serum protein 2 来自黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (序列来自 Naumann 和 Scheller, 1991);

在幼虫末龄的脂肪体中以高速合成并释放到血淋巴中去,但是迹象表明这类蛋白质在幼虫的发育过程以及成虫的性腺发育过程中(Miler *et al.*,1990; Kumaran *et al.*,1993)表达的速度较慢(Ray *et al.*,197; Webb and Riddiford,1988)。不过,在幼虫末龄的血淋巴中高度聚集,而且在预蛹期重新被脂肪体吸收。在大多数例子中,芳香蛋白并没有完全从血淋巴中消失,这可能是由于它的高度集中的缘故(Haunerland *et al.*,1980)。在 *Hyalophora cecropia*(Tojo *et al.*,1978)中进行了对在脂肪体吸收与积累的生化与电镜技术方面的详细研究。*B.mori* (Tojo *et al.*,1980)和 *Helicoverpa zea* (Wang & Haunerland,1991,1992)。在脂肪体的晶体蛋白颗粒中芳香蛋白已被明确鉴定,而且似乎这些颗粒逐渐的而不是彻底的在蛹期被破坏;事实上,很多立体在成虫脂肪体中被发现,这又意味着芳香蛋白也可能作为卵黄蛋白的氨基酸来源(Wang & Haunerland,1991)。

究竟哪里是合成的场所,哪里是贮存的地方,大部分研究还并未努力去区分脂肪体的不同区域。详细的研究只在 *H. zea* 中获得成功。这个种类中,目标定位于一种有色的贮藏蛋白上(VHDL, 见后),在合成与贮藏的场所上有了明显的区分(有关评论见 Haunerland 和 Shik,1994)。研究发现,芳香蛋白在幼虫外围的脂肪体中合成,在 5 龄幼虫的外皮层与角质层之间。然而,这白色的组织并不与芳香蛋白分离,相反的,蛋白迅速被新形成的脂肪体组织吸收,它绕在肠外位于体腔的中心部位。通过电镜研究,现在已经知道,这种内脏周围的脂肪体残留于蛹体内,并发育成成虫的脂肪体;但是外围的脂肪体却消失了。

1.2.1.3 鞘翅目

类芳香蛋白已在大量的鞘翅目种类中鉴定,包括谷类的甲虫 *Tenebrio molitor*(Deloher *et al.*,1992)和科罗里达西红柿甲虫 *Leptinotarsa ecemlineata*。后者的蛋白近来已被测序(Dekout 和 Koopmanschap,1994)。它像其他芳香蛋白一样富含芳香族氨基酸,但是与其它家族的芳香蛋白在结构上的相似性就不如原先的六聚体蛋白种类(表 1)。它发育的图谱也知道得相对较少,但是好象这类蛋白质也贮存在蛹脂肪体的颗粒中。

1.2.1.4 蜚蠊目

在美洲大蠊 *Periplaneta americana* 中,有两种类芳香蛋白颗粒已经鉴定出来(Duhamel 和 Kunkel,1983)。其中之一在整个生活周期中都存在,而另一个则几乎都在幼虫中发现。没有迹象能够说明它在脂肪体中的吸收与贮存,而且其生物作用仍未弄清楚。近来,一种发育相关贮存蛋白(development associated storage protein, DASP)被克隆,而且从 *Blaberus*

discoidalis 中被测序(Jamroz *et al.*,1996)。这类蛋白质与其他所有的六聚体蛋白同源性相似,包括其他家族的芳香蛋白(表1)。

1.2.2 双翅目的 LSP-2

双翅目第二类为人所知的的贮藏蛋白存在的数量比芳香蛋白要少,但与后者的发育历程却相似。这类蛋白也被脂肪体吸收,但其最终的命运究竟如何就无从知晓了。基于这样一个事实,这类蛋白在成虫羽化后仍继续表达,估计它对成虫来说,也是一个重要的因素(Benes *et al.*,1990)。果蝇的 LSP-2 是这组蛋白中唯一已被测序的(S.mousseron;cited in Naumann & Scheller, 1991)。它的序列与双翅目芳香蛋白和所有其他六聚体蛋白相似,但又相对的少,这意味着,在 LSP-2 与任何其他的六聚体蛋白没有亲密的亲缘关系(表1)。

1.2.3 鳞翅目富甲硫氨酸贮藏蛋白

富甲硫氨酸蛋白的甲硫氨酸含量超过 4%,与芳香蛋白形成对比的是这些蛋白质并不是糖基化合物。只是在几个鳞翅目种类中发现了该种蛋白,并没有调查过整个鳞翅目种类。在一些种类中,比如烟草天蛾 *M. sexta* 与棉铃虫 *H. cecropia*, 两种或更多的富甲硫氨酸(对碘氧基苯甲醛)已经被发现(Wang *et al.*,1992; Tojo *et al.*,1978)它们在脂肪体内的生物合成的开始时间要比芳香蛋白来得晚,一般是接近幼虫末龄快要结束的时候。接着,富甲硫氨酸蛋白就彻底的从血淋巴中消失了,并被吸收到蛹的脂肪体中去。虽然它在颗粒中的沉积作用尚未被研究, Pan 和 Telfer 确信,它脂肪体中的积累在整个蛹期没有显著下降的过程。不过,有一个有趣的现象值得指出,与所有其他种类的贮藏蛋白和六聚体蛋白相比较,较少在烟草天蛾 *M. sexta* 中雌性幼虫的富甲硫氨酸含量比雄性幼虫要明显丰富的多(Ryan *et al.*,1985)。蛋白质序列的对照比较表明,在粉纹夜蛾 *T.m* (Jones *et al.*,1993)中描述过的两种基本的保幼激素可抑制蛋白也属于这个系列(Beintema *et al.*,1994)。富甲硫氨酸六聚体蛋白的同源性相对较高,序列一致性在 44%与 77%之间(表1)。与之形成对比的是,其它鳞翅目与双翅目的六聚体蛋白的同源性则少于 34%。因为两类基本的保幼激素可抑制蛋白似乎与来自其它鳞翅目种类的富甲硫氨酸的贮藏蛋白相同。所以很自然的,后面一类蛋白在其它种类中可被保幼激素抑制。事实上,有迹象表明,来自烟草天蛾 *M. sexta* 的富甲硫氨酸蛋白只在保幼激素在幼虫末龄体内的含量降到十分之一以下时才出现(Webb & Riddiford,1988;Corppuz *et al.*,1991)。

1.2.4 保幼激素可抑制蛋白 (Juvenile hormone-suppressible proteins)

贮藏蛋白的表达时间几乎已经确定,是在幼虫末龄期保幼激素的含量降到很低时,而且长久以来人们认为是保幼激素阻止了贮藏蛋白的产生。事实上,保幼激素只对其中的某些起

到抑制作用，而不是所有的贮藏蛋白。另外，上面提到的两类基本的保幼激素可抑制蛋白，一种酸性的六聚体蛋白已在粉纹夜蛾 *T. ni* (Jones *et al.*, 1990) 中鉴定；氨基酸组成，序列的一致性和保幼激素的可抑制性表明一种近来从 *G. mellonella* (LSP-82, Memmel *et al.*, 1994) 中克隆而来的蛋白是一种类似的蛋白。这些酸性的保幼激素可抑制蛋白相互之间高度相似，但是功能却与所有其他的六聚体蛋白不同（表 1）。正是由于这个原因，对于他们的发育图谱和命运以及他们的功能是不是作为贮藏蛋白等之前所知甚少。

Godlewski 等（2001）的研究表明末龄幼虫大蜡螟 *Galleria mellonella* 在 18℃ 下进入滞育期。滞育期间，脂肪体大量合成了一类蛋白质（72~84kDa）并且分泌到血淋巴中。通过这类蛋白质 N 端的部分序列的测定表明它们属于六聚体贮藏蛋白这个家族。在滞育和非滞育个体中都检测到了两类 LHP 基因（LHP76 与 LHP82）的表达。并且两类基因一直表达到滞育的 90~100 天。在非滞育个体的脂肪体中分子量范围在 72~84kDa 之间的蛋白在幼虫末龄期的第 3 天达到峰值。之后这些蛋白就分泌到血淋巴在那里累积。在取食期后（到 6 天），这些蛋白又被脂肪体吸收并在蛹期前在这一组织中达到极高的含量。在同一种类中报道的核黄素结合蛋白在有相似的分子量（85kDa）仅在基因表达的模式和分布上有细微的差别 (Silhacek *et al.*, 1994)。LHP82 蛋白在倒二龄蜕皮后几个小时内出现，并在 2 天后在体内达到峰值。已经确定这一蛋白是保幼激素抑制蛋白 (Ray *et al.*, 1987b; Memmel *et al.*, 1994; Riddiford, 1995)。因为在 2 天后保幼激素在体内已降到检测不到的水平 (Rembold & Sehnal, 1987)。

1.2.5 核黄素结合蛋白(Ribiflavin-binding proteins)

Silhacek 等(1994)指出，1 个与核黄素蛋白结合的贮藏蛋白亚单位为 85kDa，并用 Western 印迹法得到证实。尽管与其他六聚体贮藏蛋白在结构上相似，但是已经为人所知的是，在 *H. cecropia* (Magee *et al.*, 1994)，*G. mellonella* (Miller & Silhacek, 1992) 并不是真正的贮藏蛋白，虽然它们只在幼虫末龄强烈地表达出来，但是他们在蛹期前并不会主动从脂肪体中分离出来，也不会再在蛹脂肪体中积累。它们的血淋巴在蛹羽化的时候迅速集中、减少，但是这些蛋白是简单地被水解或者被吸收到脂肪体、卵巢亦或其他一些组织中去，而不为人所知晓。这些蛋白质是糖基化合物，并似乎包含了高含量的组氨酸与精氨酸。迄今为止，还没有这些蛋白质序列的报道信息。

1.2.6 高密度脂蛋白 (VHDL)

一种非六聚体贮藏蛋白在棉铃虫 (Haunerland & Bowes, 1986) 和其他夜蛾科种类 (Jones *et al.*, 1988; Greenstone *et al.*, 1991) 中被检出这一类蛋白质由 150 Kda 个亚单元的二聚或四聚体

复合而成。他们是由两种不寻常的所有物鉴别。由于非共价束缚胆绿素和它是非常高密度的鳞翅目蛋白（VHDL）含大约 10%类脂，所以它是蓝色的。它在幼虫末龄的外围脂肪体内合成，而且在它特别地在蛹期前被外围的脂肪体吸收之前，在血淋巴中高度聚集。在脂肪体中，它能在蛋白质颗粒中被发现，但是它又明显的在几天之内被分解消化。它的蛋氨酸组成与普通的蛋白质并，没有什么不同，所以似乎这类蛋白质与上面提到的六聚体贮藏蛋白并无关联；然而，序列的信息并不是可靠的。VHDL 是迄今为止唯一一种非六聚体幼虫血清蛋白中为人所知它的功能是贮藏蛋白的。根据报道，在膜翅目种类 *Apis mellifera*(Shipman *et al.*,1987)和 *Camponotus fessinus*(Wheeler & Martinez,1995)存在一种有着类似脂类与脱辅基蛋白结构的而不带发色团的 VHDL，但是它发育模式图尚未建立。

1.2.7 富酪氨酸蛋白（Tyrosine-Rich proteins）

富酪氨酸蛋白（tyrotaurins）和相关的富酪氨酸贮藏蛋白是在鞘翅目昆虫的脂肪体内酪氨酸含量可达 27%的蛋白质(Delobel *et al.*,1992)。它们的合成与在脂肪体内的累积是在化蛹前不久发生的。而这些蛋白质在蛹体内是贮存在脂肪体的蛋白质颗粒中。在之后的发育过程中，这些颗粒部分消失了，可能这些富酪氨酸蛋白的酪氨酸残基被用于拟成虫的表皮结构的生物合成过程。虽然它们明显的达到与其他贮藏蛋白相似的功能。富酪氨酸蛋白与前者又着根本不同的方面， 不仅在于它们不是小的而是很大的不确定的大小(30~65 KDa),而且也在于它们从不释放到血淋巴中去。相反的，这些贫乏地的可溶性蛋白看上去似乎在合成之后迅速被贮存到蛋白质颗粒中。没有这些有趣蛋白质的结构或顺序的数据资料存在，事实上，它们可以代表独立进化的氨基酸贮存的机理。一些鞘翅目种类只有六聚体蛋白，而没有富酪氨酸蛋白，其他的一些则只有富酪氨酸蛋白或两者都表达的蛋白质。

1.3 结论

所有的六聚体蛋白相关性明显很强，而且根据假设，它们演化起源于血蓝蛋白。但是不同昆虫种类的六聚体蛋白家族之间似乎并无紧密的联系。即使它们在氨基酸组成上相似。血蓝蛋白分子的结构中包含有许多疏水氨基酸。包括芳香基在内的残基被疏水蛋白氨基酸取代不大可能导致整个结构发生重要的变化，因而一种芳香蛋白在不同种中独立的发展，这是适应贮存芳香族氨基酸需要的结果。这个假说依赖于这样的事实，既在芳香蛋白中保存的芳香族氨基酸不比其他六聚体蛋白中的多。事实上，当所有昆虫的六聚体蛋白用 Clustal W 合成直线的程序校过之后，苯丙氨酸和酪氨酸残基在全部六聚体蛋白中的很多位置上不再相同（图 1）。没有一种芳香族氨基酸残基能贮存在所有的芳香蛋白上又不在其他六聚体蛋白中。

另一方面,一些鞘翅目种类采取了不同的战略,即以不溶性蛋白的形式贮存。

除了芳香蛋白之外的贮藏蛋白虽然独立的进化着,可是也为了适应在蛹期贮存氨基酸的需要和利用,而强烈表达着血蓝蛋白基因,另外一些功能完全不同的蛋白质,也演化于血蓝蛋白前体。这些包括半变态昆虫的六聚体蛋白和上面提到的核黄素绑定六聚体蛋白没有被吸收到脂肪体中去。甚至,其他非六聚体的昆虫蛋白也发现了一个明显的序列,它与血蓝蛋白是同源的: prophenoloxidasases、果蝇 *D. melanogaster* (Fujimoto *et al.*,1995)、*B. mori* (Kawabata *et al.*,1995)和烟草天蛾 *M. sexta* (Hall *et al.*,1995) (序列同源性的为 29%~39%) 和一些从双翅目 (Burmester 和 Scheller,1995; Chung *et al.*,1995;)更少同源性的芳香蛋白前体等大量的血清蛋白。

2 蛋白的贮藏和利用

虽然不同演化起源的蛋白质可以作为贮藏蛋白,但是一些六聚体蛋白没有被脂肪体吸收和贮存,因而它们并不是贮藏蛋白。贮藏蛋白的本质是它能被脂肪体特异性的识别与摄取。从贮藏蛋白被人类发现以来就一直有这样一个疑问,究竟为什么它们在脂肪体合成后就被释放到血淋巴里,而且才几天之后又被脂肪体摄取。一些假说意图解释这个复杂的模式,但是并没有出现让人一致信服的解说。它可能只是无所不在的水溶性的血淋巴蛋白演化的一个结果。它们贮存到脂肪体的功能需要进化出一个有效的摄取机制。贮藏蛋白的吸收只发生在蛹期前后的一个短暂的时期,而且这种吸收是一个细胞内吞过程。因为贮藏蛋白通常在血淋巴中的浓度很高,即便内吞作用没有选择性,也使得贮藏蛋白向脂肪体输入是可能的。辣根过氧化物酶的原始细胞实验证明了这一点 (Locke 和 Collins, 1968)。然而,蛋白质从血淋巴中清除掉,又积累到脂肪体的受体引导过程表明吸收是选择性的(Pan 和 Telfer,1992)。这样一个过程并不会排斥其他大量非特异性的血淋巴蛋白,因为细胞腔的胞内吞的泡囊总是圈住一小团体积的血淋巴。的确,当棉铃虫 *H. zea* 的脂肪体潜伏着相同数量的标记芳香蛋白和一来自体外的外来蛋白 (IgG) 的时候,一小数量的 IgG 积累在这个组织中,但是超过十倍的芳香蛋白被吸收了(Wang 和 Haunerland, 1994b)。根据观察到的选择吸收作用,这种吸收应该是被特异性的内吞受体引导的。这种潜在的贮藏蛋白的受体已经在双翅目和鳞翅目昆虫中找到了。

2.1 双翅目

在双翅目脂肪体中存在一种芳香蛋白的受体的证明可以追溯到 1983 年, 当时 Ueno 等 (1983) 报道了同位素标记的芳香蛋白以一种特别饱和的方式, 即 $K_d=4 \times 10^{-9}$ M 结合在棕尾别麻蝇脂肪体膜的某些区域。与其他大多数所知的其他动物内吞过程形成对比的是, 大量的糖类似乎并不会影响这种结合。芳香蛋白的结合需要 Ca^{2+} 离子且依赖于一定的 pH 值, 其最适的 pH 值是血淋巴的 pH 值为 6.5。在之后的研究中, 这些研究人员发现一种黄素光色素 lumichrome, 能阻止芳香蛋白与它的受体结合。可能由于 Ca^{2+} 的存在, lumichrome 与芳香蛋白以一定的比例结合 (每个亚基一个分子), 光色素-芳香蛋白复合体就不再和受体结合。作者认为某一种类光色素分子是芳香蛋白与受体结合点, 而且这个分子参与对芳香蛋白的识别。

运用配位体印迹(ligand blotting)技术, 证明这个假定的芳香蛋白的受体每个分子重 120 kDa。与芳香蛋白的结合仅在蛹的脂肪体中才会出现, 在幼虫脂肪体内并无, 除非昆虫用蜕化类固醇 ecdysteroids 处理过。其他的证据显示, 在幼虫体内的受体处于不活化的前体状态 ($M_r=125$ kDa), 而且这种“隐性受体”被酶切后就使得活化态的 120 kDa 蛋白出现了 (Ueno 和 Natori, 1994)。Chung 等 (1995) 近来克隆了这个芳香蛋白受体, 而且证实了他们早先的结论。现在看来, 先前叫做神秘受体的 125 kDa 蛋白似乎是一种无关蛋白。此外, 因为已经明白脂肪体膜包含了大量的蛋白质颗粒, 所以这个 120 kDa 受体究竟是膜蛋白, 还是在颗粒内结合了芳香蛋白的细胞内蛋白成了一个疑问。后者的可能性更大一些, 因为他们在脂肪体膜上用亲和性抗体没有检测到 120 kDa 蛋白或交互反应物 (crossreactant material), 在净化脂肪体细胞膜内的前体之后, 仍然可以看到有荧光在蛋白质颗粒中。有意思的是, 同时在幼虫与蛹脂肪体测到免疫反应抗体, 只有后者的能与芳香蛋白结合。用 Western 印迹证明了幼虫与蛹脂肪体都含有三种具免疫活性的蛋白, 120、76、和 53 kDa 的, 但是幼虫组织内 120 kDa 蛋白的含量极微, 而它恰恰是能与芳香蛋白结合的。氨基酸末端的序列分析提供了明确的证据, 那些小一点的蛋白是 120 kDa 蛋白的片段。因此, 可以肯定在幼虫体内 120 kDa 的芳香蛋白的结合蛋白迅速的被分解成两个片段, 起作用的可能是一种特异性的蛋白酶。20-羟基脱皮酮在蛹期前的存在, 钝化了这种蛋白酶。然而, 20-羟基脱皮酮本身也会导致 120 kDa 蛋白的表达。

受体的 cDNA 决定了 1163 个氨基酸的遗传密码, 从内质网的靶标开始直到 120 kDa 的蛋白质序列的 N-末端序列。这也是那个 76 kDa 片段 695 个氨基酸残基的 N-末端。那个 53 kDa 片段的序列则从 713 个氨基酸开始。这些序列清晰的表明了相似性 (29.1% 一致, 66.2% 同源) 一种从果蝇脂肪体内提取出来已经测序了的但未知功能的蛋白 (fbp1 蛋白, Maschat et

al.,1990),和丽蝇 *Calliphora* 中单独测定的芳香蛋白受体(Burmester & Scheller, 1995)有 46.1% 相同。

在丽蝇 *Calliphora* 膜上,3 种绑定蛋白在 1992 年被 Scheller 和他的合作者 (Burmester 和 Schelle, 1992), 每个分子重 130, 96 和 65 kDa。用放射性碘标记芳香蛋白的直接配体印迹表明, 只有 96 kDa 蛋白能被标记。但是当被污染的蛋白刚开始先与配体芳香蛋白一同培养, 然后与抗芳香蛋白的培养, 则 3 种蛋白都见, 这是一个更敏感的方法(与配体结合的免疫印迹)。然而在体外 mRNA 却只能翻译 130 kDa 蛋白。所有 3 种蛋白与特异性的抗体的产生交互反应, 由此看来 96 kDa 和 65 kDa 的蛋白好像是 130 kDa 蛋白的片段。在芳香蛋白吸收以前, 130kDa 蛋白和 96 Da 蛋白在幼虫脂肪体显著存在; 65 kDa 蛋白虫前期则无, 但是从芳香蛋白吸收开始, 它的含量就逐渐上升。由芳香蛋白的摄取和 65 kDa 的结合蛋白被 20-羟基促脱皮酮的诱导, 可以得出一个结论, 96 kDa 肯定在芳香蛋白被脂肪体摄取发生前受到修饰, 并很可能解理出 65 kDa, 而后者可能是活化的芳香蛋白的受体(Burmester 和 Schelle, 1995)。96 kDa 蛋白本身是 130 kDa 蛋白基因的产物。除了一个清晰的序列表明麻蝇受体和果蝇 *Drosophila* 的 *fbp1* 基因相似(27.8%相同)之外, 这个受体也与它的配体芳香蛋白相关(17.8%相同)。

如前所述, 麻蝇和丽蝇芳香蛋白绑定蛋白的序列非常相似, 因而, 我们可以肯定它们是来自不同种类的相当蛋白, 即使初一看, 它们报导的功能和活化似乎是对立的。然而, 当我们考虑到构建的序列图谱时, 两者研究的结果就更一致了。两者的 cDNA 序列包含了内质网靶标网状组织序列在 5'末端。

Burmester 和 Scheller (1995) 假设了一个简单的跨膜的 α -螺旋 (1936-L953): 在构建的麻蝇 *Sarcophaga* 和丽蝇 *Calliphora* 受体的图谱中, 这个区域保存的很好(61%相同, 89%相似)显示 *Sarcophaga* 蛋白也能残留在淋巴液膜上。在麻蝇 *Sarcophaga* 中整个蛋白多 90 个氨基酸残基, 而计算出的分子量与 SDS 电泳得到的结果相符合。分裂的位置只在 *Sarcophaga* 中已确定; 它发生于 R713 与 S714 之间。在构建的序列中, *Calliphora* 有一个同工的序列在这个位置(R824/S825)上, 在两个序列上有着一段保存的 6 个氨基酸(RYRRSL)。这事实上为特异性的蛋白酶提供了一个位置。假设在丽蝇 *Calliphora* 中也在此发生的话, 则最终的片段的一个分子重 92000 和 48400, 分别与麻蝇 *Sarcophaga* 中 76 和 53kDa 蛋白相同。在两个种类中, 如果 20-羟基促脱皮酮不存在, 那受体是不能被激活的。Chung 等(1995)对这个吸收有不同的看法, 他们认为 120 kDa 蛋白的分裂被 20-羟基促脱皮酮抑制了, 从而保持了活化的芳香蛋白绑定蛋白的完整, 而 Burmester 和 Scheller 提供

的证据则表明 96kDa 蛋白是被 20-羟基促脱皮甾酮激活的, 它通过进一步分裂出活化的 65kDa 受体。然而, 必须指出的是, 假定的跨膜螺旋定位于小片段 (840~859 或 937~953) 中, 而一旦在两个种类中分裂发生在同一位置上, 该位置对于 96kDa 蛋白或它的 65kDa 片段的功能是不一样的, 而且, 小片段保存的比大片段的更多 (表 2)。因为在两个亲缘关系紧密相关的双翅目种类中, 会又不同调节功能的同源蛋白看来是不可能的。这可能要在两者的研究中采用了不同的实验方法来对这个矛盾的结果负责。当确信的证据被这些和其他作者找出来时, 表明 20-羟基促脱皮甾酮能调节双翅目芳香蛋白的吸收, 而它究竟是如何完成的仍未弄清楚, 芳香蛋白绑定蛋白是否是在跨膜的内吞受体上克隆也不明了。这些重要的问题无疑是将来工作的重点。

2.2 鳞翅目

到今天为止, 贮藏蛋白受体只在一种鳞翅目种类中被研究, 即棉铃虫, *Helicoverpa zea* (Wang 和 Haunerland, 1993; 1994a)。在这个种中 (见上文) 观察到受体的性质和定位与其体内两类不同的脂肪体有直接联系。早期的研究表明, 芳香蛋白和非六聚体贮藏蛋白 VHDL 只有蛹期脂肪体内积累而不在幼期脂肪体中积累。这显示出这个特异性的摄取只在前一组织中发生 (Haunerland *et al.*, 1990)。为了搞清楚作为这些贮藏蛋白受体的结合性质, VHDL 和芳香蛋白被标记和与脂肪体细胞一起培养。两类蛋白以与脂肪体细胞相互作用中出现特异性和饱和度, 两者结合量相似, VHDL 是 7.8×10^{-8} , 而芳香蛋白是 9.2×10^{-8} (Wang & Haunerland 1993; 1994a)。而牛血清蛋白不与膜作用, 也不影响 VHDL 或芳香蛋白与膜的结合量。在膜与标记的芳香蛋白培养时, 若存在过量的非标记芳香蛋白, 标记化合物与膜结合量就比较少。同样, 用 VHDL 也减少标记的 VHDL 的结合, 它也使得未标记得芳香蛋白结合量减少, 可以想象这是受体饱和的结果。说明单个受体调节两种结构得贮藏蛋白得摄取。2 种蛋白结合的 PH 为 6.5~7.5, 至少需要 4 mM 的钙离子, 这与丽蝇种观察到的很相似, 只是不象双翅目的贮藏蛋白那样结合的牢固。

表 2 贮藏蛋白受体片段比较

麻蝇(<i>Sarcophaga peregrina</i>)		丽蝇(<i>Calliphora vicina</i>)		麻蝇/丽蝇 相同性(%)
已报道 分子量(u)	计算所得 分子量(u)	已报道 分子量(u)	计算所得 分子量(u)	
120 000	132 346	130 000	148 255	46
76 000	81 964	96 000	99 986	40
53 000	50 400	未测	48 443	55

麻蝇资料由 Chung 等(1995)报道, 丽蝇资料由 Burmester 和 Scheller(1992)报道。并分别根据核
酸序列进行计算(Haunerland, 1996)。

Toyoshi 等(1998)通过多克隆抗体的免疫扩散明确了 3 种贮藏蛋白(SL-1,SL-2 and SL-3,70-80kDa 亚单位的六聚体)和两种胆绿素结合蛋白(biliverdin-binding protein)(BP-A and BP-B,165kDa 的二聚体)在海灰翅夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫期与蛹期其血淋巴和脂肪体内的浓度。SL-1 and SL-2(富甲硫氨酸)首先在 1 天的六龄(末龄)幼虫的血淋巴中出现,在后面的取食期含量显著的增加,而在离食期(gut purge)后其全部被脂肪体吸收。SL-3(芳香蛋白)则在从蜕皮到末龄的都被测到,在整个末龄的取食期含量一直上升,在其他的贮藏蛋白被脂肪体吸收后数小时内部分被脂肪体吸收。BP-A 与 SL-3 的模式几近一样;BP-B 则在取食期逐渐增加而在蜕皮时下降,至倒二龄其体内的含量达到峰值,但之后其含量下降的相当多,在末龄幼虫时维持在较低的水平。部分 BP-A 和几乎全部 BP-B 在 SL-1 and SL-2 被脂肪体吸收之后的 8 h 后,重新被脂肪体吸收。这一事实意味着胆绿素结合蛋白作为氨基酸贮藏蛋白的功能结果也揭示了一个不同的这些蛋白被脂肪体吸收的机制。

Diana 等(2000)对菜蛾 *Plutella xylostella* 幼虫后期至 4 天成虫的贮藏蛋白用 Western 杂交印迹进行了量化。贮藏蛋白的峰值出现在蛹期早期,雌虫是雄虫的两倍。对成虫而言,在蛹期持续下降而在羽化后一天内只剩痕迹。对雌虫而言,贮藏蛋白的含量下降直到羽化,然后在蜕壳后的 4 小时内迅速的上升到原来峰值的 2/3。这一羽化后(post-eclosion)的增加,意味着雌成虫合成六聚体来重吸收氨基酸。之后,随着卵黄蛋白的合成和产卵,贮藏蛋白的水平下降。就这一点而言,在成虫期吸收氨基酸合成贮藏蛋白对昆虫治理而言有着广泛的意义。

2.3 结论

Burmester 等(1999)的研究表明六聚体蛋白通过细胞膜的运输被受蜕皮激素调节的特异性的受体引导。先合成受体的蛋白质前体,然后被激活。这一受体蛋白质与其六聚体蛋白配体高度相关。他们对六聚体蛋白和其受体的 AA 序列进行了联配,比较结果显示六聚体蛋白和其受体从同一血蓝蛋白前体演化而来,关于这一点 Burmester(2004)对所有节肢动物的血蓝蛋白及其进化做了总结。

综合以上看法,昆虫贮存蛋白摄取和利用模式已初露端倪,但其内在的微观现象还存在很多问题,有待于进一步研究和揭示。

3 作为时间特征性生化指标的可行性

如前所述,贮藏蛋白的含量变化在蝇类幼期是极为显著的,尤其在三龄幼虫是如此。以红头丽蝇为例,到停止取食时其贮藏蛋白含量可占血淋巴总可溶性蛋白的 50%以上,化蛹期有所下降。另外对借古比天蚕蛾、家蚕和大芭蕉弄蝶的研究结果中,当血淋巴中蛋白质含量下降是,脂肪体内蛋白含量上升等等。所有这些现象都表明,贮藏蛋白含量在特定昆虫体内随着发育呈现规律性的变化,因此如能把这一规律性变化转换成和日龄的关系,必将为法医昆虫学带来可用于日龄推断的新指标。

第二部分 试验研究

第一章 杭州地区常见尸食性蝇类的分子鉴别

在法医调查中尸食性蝇类幼虫常常能被用来推断死亡间隔时间。其中尤以丽蝇科昆虫最常见。但是由于尸食性蝇类幼虫往往形态比较相似而它们生物学特性则有较大不同，特别是生长发育速率差异甚大(Catts & Haskell, 1990)。故在刑事调查中，利用昆虫的生长发育来推断死后间隔时间(Post-Mortem Interval PMI)的第一要点是物种的正确鉴定。丽蝇的成虫诚然是可以通过形态来鉴定种类，但其幼期颇难辨别，尤其是当现场只有蛹壳或低龄幼虫时，鉴定到种相当困难。它们往往需要饲养至成虫才能做可靠的鉴定，这样，势必延迟了破案速度。与此同时，在饲养过程中，幼虫一旦中途死亡就有可能造成无法鉴定的后果。总之，实际的工作迫切要求在死亡现场采集昆虫之后，能够作出既快速又可靠的鉴定。因此，一套简易可靠的针对这些种类的 DNA 鉴定方法的建立是非常必要的(Byrd & Castner, 2000; 胡萃, 2000; Greenberg & Kunich, 2002)。

目前在国外，一系列围绕着尸食性昆虫幼虫的 DNA 鉴定方法研究正在开展。北美(Sperling *et al.*, 1994; Stevens *et al.*, 2001; Wells *et al.*, 2001)、夏威夷(Stevens *et al.*, 2002)、澳大利亚(Wallman *et al.*, 2001; Harvey *et al.*, 2003)和欧洲(Benecke, 1999; Malgon, *et al.*, 1999; Vincent *et al.*, 2000)等地区均进行了这方面的探索。作者开展本文的研究填补了国内乃至亚洲在这方面的空白。之前的研究结果表明，线粒体 DNA 在鉴定蝇类的物种方面有独到的作用。因此，本文通过测定细胞色素氧化酶亚基 II (COII) 的序列来探索杭州地区常见尸食性蝇类的 DNA 鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

6 种尸食性蝇类，包括麻蝇科 (Sarcophagidae) 2 种：肥须亚麻蝇 *Parasarcophaga crassipalpis* (Macquart)、棕尾别麻蝇 *Boettcherisca peregrina* (Robineau-Desvoidy); 丽蝇科 (Calliphoridae) 3 种：巨尾阿丽蝇 *Aldrichina grahami* (Aldrich)、大头金蝇 *Chrysomya megacephala* (Fabricius)、丝光绿蝇 *Lucilia sericata* (Meigen); 蝇科 (Muscidae) 1 种：家蝇 *Musca Domestica* Linnaeus 以采自杭州的幼虫建立种群。取刚羽化后的成虫置-70℃冰箱保存备用。

1.2 DNA 抽提

总 DNA 的抽提根据 Sperling 等 (1994) 的方法稍作改进，具体步骤如下：

将虫体从-70℃冰箱取出，置 1.5 ml 离心管中加液氮迅速磨成粉末；加入 800 μ l 抽提缓冲液（10 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.1% SDS）悬浮粉末；加入适量蛋白酶 K(100 μ g)，37℃温浴 2~3 小时；加入 1/10 体积 5 M NaCl 混匀，5000g 离心数秒；上清液加入等体积酚：氯仿：异戊醇(25:24:1)抽提至两相界面无白色沉淀；取上层水相加入 1/10 体积 3 M NaAc(pH 5.2)，2 倍体积的无水乙醇，20℃冰箱放置半小时；取出后高速离心 10 分钟。沉淀用 70%乙醇洗涤；干燥后，加入 50 μ l ddH₂O 溶解 DNA。

1.3 扩增及测序

序列区域选定为线粒体 DNA 的 COII 的部分序列。所使用的引物为 C2-J-3138(5'-AGAGCCTCTCCTTTAATAGAACA-3)

TK-N-3775(5'-GAGACCATTACTTGCTTTCAGTCATCT-3')。

PCR 反应体系为 50 μ l:10*buffer 5 μ l, 25 mmol/LMgCl₂ 4 μ l, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μ l, 60 μ mol/L 一对引物各 1 μ l, 0.5 μ l Taq 酶, 模板 DNA 1 μ l, 加入 ddH₂O 至 50 μ l。反应在 Thermo Hybaid 型 PCR 仪上进行。

PCR 反应条件为：95℃ 3 min, 45℃, 1 min, 72℃ 1.5 min; 94℃ 1 min, 45℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。

PCR 产物电泳检测后，跑低熔点琼脂糖电泳，所需条带切下后用 DNA 回收柱纯化。用上述引物在 MegaBACE 1000 DNA 分析系统上直接测序。

1.4 序列分析

多序列对比程序使用 CLUSTAL X1.81 来寻找种内和种间核苷酸差异。本文中所用的序列比对参数为：gap open penalty 10, gap extension penalty 0.05（多序列比对）。

用 Clustal X 建立 NJ 树，结果在 NJplotwin95 种显示。最大简约法(maximum parsimony analysis)来计算进化枝的置信值。共进行 1000 次自举检验（bootstrap）。

2 结果

2.1 序列数据

目的片段的 DNA 序列 数据见图 1.1。

利用 Megalign 软件，对序列差异百分比和碱基替代情况进行了统计，结果见表 1.1。

从表 1.1 中可以看出不同的种类间序列差异达到 10%左右，其中巨尾阿丽蝇与丝光绿蝇

的差异仅为 8.3%，而它们与大头金蝇的差异为 10%左右，而两种麻蝇之间的序列差异也在 10%，而不同科之间的种类差异则大于 10%。

表 1.1.六种尸食性蝇类 COII 基因片段序列序列同源性(上三角)与差异性(下三角)
Table1.1 Percent identity(upper triangle) and divergence(lower triangle) for six species of carrion-breeding flies mtDNA COII segment sequences

	1	2	3	4	5	6
1		83.2	88.9	82.5	89.0	83.0
2	14.5		83.4	77.5	83.1	85.1
3	10.4	14.0		82.9	90.0	84.7
4	15.4	19.4	15.2		80.5	79.7
5	9.8	13.6	8.3	17.0		83.5
6	14.3	10.0	12.6	16.6	12.8	

注:1 大头金蝇; 2 棕尾别麻蝇; 3 巨尾阿丽蝇; 4 家蝇; 5 丝光绿蝇; 6 肥须亚麻蝇。

序列测定的区域为 638 bp。每个样品都进行了正向与反向测序。将测序所得序列提交至 GenBank 进行 Blast 检索，结果表明与其他蝇类的对应片段有很高的同源性，丝光绿蝇与家蝇的序列与已知序列相似性程度高达 99%。其他四种新序列登录于 GenBank (accession number: AY350795-AY350798)。不同种类的序列比较表明，种间的序列差异范围从 8.3 到 19.4%（见表 1.1）。序列相差最少的两个种类是巨尾阿丽蝇与丝光绿蝇（8.3%），他们之间的差异性与前人对 COII 和 COI+COII 的研究结果相符合。另外不同序列之间的差异有缺失，这与前人在比较麻蝇与丽蝇时曾经得到过 9 bp 的缺失相符合。

另外，还对巨尾阿丽蝇的幼虫也进行了 DNA 扩增和测序，结果表明其与成虫完全一致。

2.2 系统发育

系统发育分析是基于亦测定的序列探求不同种类间的相互关系。根据总长约 640bp 的 COII 序列，用 NJ 法构建分子系统发育树（图 1.2）。序列的转换和颠换赋予相同的权重，bootstrap(1000)验证结果表明分支的最高和最低置信度为 995 与 602 。

分子发育树的结果表明棕尾别麻蝇与肥须亚麻蝇归为一类，节点值为 981。而三种丽蝇科的种类则归在一起，而家蝇与它们之间的距离较远。

3 讨论

3.1 物种鉴定

本文的显示仅用一对引物即可在所有的试验样品中扩增到目的片段，同样的结果在对澳

大利亚尸食性蝇类的研究中也得到过 (Wallman *et al.*, 2001)。所以这一引物及其之间的序列在物种鉴定方面拥有较大的潜力。家蝇和丝光绿蝇只须通过与 GenBank 中的序列进行比较就可以得到物种的鉴别, 因其序列的差异几乎可以完全归因于个体间的差异。之前的研究通常以 COI 序列为多, 而通过本章的研究综合前人的研究结果 (Wallman *et al.*, 2001; Vincent, *et al.*, 2000), 可以明确 COI 作为全球动物生物鉴定 DNA 靶标的作用, COII 也同样能够做到, 只是目前在应用上稍显不足。

种类鉴定是法医昆虫学的基础, 在对死亡时间做精确估计之前, 必须对尸体上昆虫进行正确鉴定。本文建立的 DNA 序列分析方法简便可靠, 是法医学应用中一种值得推广的方法。在杭州地区, 供试六个种类是尸体上常见的蝇类, 实践中常常让刑侦人员困惑的是幼虫的鉴别, 现在有了该方法, COII 就能轻易的扩增出来, 考虑的法医实验室的条件, 完全能够做到这一点。当然这里还有一个问题, 就是我们测序的种类不够全面, 一旦在实践中遇到没有测序过的种类就会出现问题, 所以将来的工作就是扩大测序的种类。

3.2 地理种群间的差异探讨

近年来, 尸食性蝇类幼虫的分子鉴定的热点趋于研究地理种群间的差异。这里我们也对这一问题进行了初步探讨。通过比较我们测定的家蝇与丝光绿蝇序列以及 GenBank 中相应种类的序列, 发现丝光绿蝇只发生了一个碱基替换。

因此, 我们可以初步确信在不同地区之间同一种类的 COII 序列相当稳定。因而在实践中, 有时并不需要对每一个地区的尸食性昆虫种类都进行测序分析, 而是根据数据库中已有的序列就已可确定。通过这一方式, 可以节约大量的资金。

巨尾阿丽蝇	AATGAAGAGTTTATACT---AGAAATTCATTTAATAAAATAA-TTTACTGGGATTCTTT
丝光绿蝇	-ATGAAGAATTATATTATT-AGAAATTCACCTTAATAAAGTAA-TTTACTGGAATTCCTT
大头金蝇	AATGAAGAGTTTACATTATT-AGAAATTCACCTTGATAAAGTAA-TTTACTGGAATTCCTT
棕尾别麻蝇	AATGAAGAGTTTATATTATTAGAAATTCATTTGATAAATAAGTTTACAGGAATTCCTT
肥须亚麻蝇	AATGAAGAGTTTATATTATTAGAAATTCATTTGATAAATAAGTTTACAGGAATTCCTT
家蝇	AATGAAGAGTTTATATTATTAGAAATTCATTTAATAAAATAA-GTTATAGGAATTCCTT
	***** *
巨尾阿丽蝇	CAATGACAATTGGTATAAACTATGATTA-GCTCCGCAAAATTTCTGAACATTGTCCATAA
丝光绿蝇	CAATTACAATTGGTATAAACTATGATTA-GCTCCACAAATTTCTGAACATTGTCCGTAA
大头金蝇	CAATTACAATTGGTATAAACTATGATTA-GCTCCACAAATTTCTGAACATTGTCCATAA
棕尾别麻蝇	CAATTACAATTGGTATAAACTGTGATTAAGCTCCACAAATTTCTGAACATTGTCCATAA
肥须亚麻蝇	CAATTACAATTGGTATAAATCTATGGTTA-GCTCCACAAATTTCTGAACATTGTCCGTAA
家蝇	CAATTACAATTGGTATAAATCTATGGTTA-GCTCCACAAATTTCTGAACATTGACCATAA
	***** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
巨尾阿丽蝇	AATAAACCCAGGTCGGTTAATTAAGAAGTTGTTTGGTTAATCGACCAGGAGTTCATCT
丝光绿蝇	AATAAACCTGGCCGGTTAATTAAGAAATTTGTTTGGTTAATCGACCAGGAGTTCATCT
大头金蝇	AATAAACCCAGGTCGGTTAATTAAGAAGTTAGTTTGGTTAATCGTCTGGTGTACCATCT
棕尾别麻蝇	AATAAACCTGGTCGATTAATTAAGAAATTTAGTTTGGTTAATCGTCTGGTGTACCATCT
肥须亚麻蝇	AATAAGCCTGGTCGATTAATTAAGAAATTTAGTTTGGTTAATCGTCTGGTGTACCATCT
家蝇	AGTAGTCTGTTGGTTAATTAAGAAATTTAGTCTGATTAGTCTGGCCAGGTTCTCATCA
	* *
巨尾阿丽蝇	ACCTTTACTCCTAGAGCTGGAATAGTTCAGAATGAATTACGTCTGACGTGTTACTAAA
丝光绿蝇	ACCTTTACTCCTAGTGTGGGATAGTTCAGAATGAATTACATCAGCGGAGTTACTAAA
大头金蝇	ACCTTTACTCCTAAAGCTGGAATAGTTCAGATGAATTACGTCTGCTGTTACTAAA
棕尾别麻蝇	ACCTTTACTCCTAAAGCGGAACTGTTCAAGAATGAATTACATCAGCGGCTGTTACTAGA
肥须亚麻蝇	ACCTTTACTCCTAGTGCAGGAAGTTCAGAAGTGAATTACATCTGACGTGTAAGTAAA
家蝇	ACTTTCACCTCCTAAGGCAGGAATAGTTCATGAATGAATTACGTCTGCTCTCACTAAA
	* *
巨尾阿丽蝇	ATTGCAATTTGGAATTTATTGGTAAACTA-CTCGGTTATCAACATCTAATAAGCGAAA
丝光绿蝇	ATTGCAACTTGAGAATTTATTGGTAAACTA-CTCGATTATCTACATCTAATAACGAAA
大头金蝇	ATTGCAATTTGGAATTTATTGGTAAACTA-CTCGATTATCAACGTCTAGTAGCGGAA
棕尾别麻蝇	ATTGCAATTTGGAATTTATTGGTAGTACTATCTCGATTGCTACATCAAGTAATCGGAA
肥须亚麻蝇	ATTGCAATTTGAGAATTTATTGGTAGTACTA-CTCGATTATCAACATCTAATAATCGAAA
家蝇	ATACGAATTTGTAATTTATTGGTAAGATTA-CTCGGTTATCAACATCTAGCAATCGAAA
	* *
巨尾阿丽蝇	ACTATCAATTGATAATTCATTAGTAGGAATTATATATGAATCAAATTCATATGTTTTAAA
丝光绿蝇	GCTATCAATTGATAATTCGTTAGTAGGAATTATATATGAATCAAATTCATATTTGCAAA
大头金蝇	GCTATCAATTGAYAGTTCTGTTAGTAGGAATTATATATGAATCAAATTCATATTAGCAAA
棕尾别麻蝇	TCTATCAACAGATAGTTCATTGTTAGGAATTATATATGAGTCAAATTCATATATCAAAA
肥须亚麻蝇	TCTATCTAATGATAATTCATTAGTGGGATTATGTAAGAATCAAATTCATATTAGTAAA
家蝇	ACTATCAATGCATAATTCATTAGAGGGATTATGATGAATCAAATTCATATTTTGAA
	***** *
巨尾阿丽蝇	GTCTGAATATTCATAACTTCAGTATCATTGATGTCCAATTCCTTTTAAAGTAATAGAAGG
丝光绿蝇	ATCTGAATATTCATAACTTCAATATCATTGATGACCAATTCCTTTTAAAGTAATAGAAGG
大头金蝇	ATCTGAATATTCATAACTTCAATATCATTGATGTCCAATAGCCTTTTAAAGTAATAGAAGG

棕尾别麻蝇	GTCTGAATATTCATAACTTCAGTATCATTGATGACCAATAGTCTTTTAAAGTGATAGAAGG
肥须亚麻蝇	GTCCTGAATATTCATAACTTCAATATCATTGATGACCAATAGTCTTTAATGTAATTGAAGG
家蝇	ATCTGAATATTCATAACTTCAATATCATTGATGTCCAATAGCTTTTAAATGTAATTGAAGG

巨尾阿丽蝇	TTCATTAATTTTCATCTAGTAAATATAAAAGTCGAAGAGAAGGAAATGCAATAAATAATAA
丝光绿蝇	TTCATTAATTTTCATCAAGTAAATATAAAAGTCGAAGAGAAGGAAAGCAATAAATAATAA
大头金蝇	TTCATTGATTTTCATCTAATAAGTATAAAAGTCGTAAAGAAGGAAAGCAATAAATAATAA
棕尾别麻蝇	TTCATTAATTTTCGCAAGTAAAGTATAAAAGACGAAGAGAAGGAAAGCAATAAATAAAAG
肥须亚麻蝇	TTCATTAATTTTCATCTAATAAATAATAAGAGACGAAGTGAGGGCAATGCAATAAATAATAA
家蝇	TTCATTAATTTTCGCTCTAATAAATAATAAAGCGGTAGAGAAGGAAAGCAATAAATAATAA

巨尾阿丽蝇	AATAATTGCAGGTAAAAATTGTTCAAGT-AATTTCAATAGTTTGTCCGTGTAATAAATATC
丝光绿蝇	AATAATTGCAGGTAAAAATTGTTCAAAT-AATTTCAATAGTTTGTCCGTGTAATAAATATC
大头金蝇	AATAATTGCAGGTAGAATTGTTCAAAT-AATTTCAATAGTTTGTCCGTGAAGTAAATATC
棕尾别麻蝇	AATAATTGCTGGCAAAATAGTTCAAGT-AATTTCAATAGTTTGTCCATGTAAAAGGTATC
肥须亚麻蝇	AATAATTGCTGGCAGAATAGTTCAAGTGAATTTCAATAGTTTGTCCATGTAAAAGATATC
家蝇	AATAATTGCTGGAGAATTGTTCAAAT-AATTTCAATGGTTTGTCCATGAAGTAAATAAC

巨尾阿丽蝇	GATTTACATATTTATTAATAAATAGTATAAATATTAATATCCTACTAGAAATAGTAA-TT
丝光绿蝇	GATTTACATATTTGTTAAAAAATAATATAAACATTAAAGTATCCTACAAGTACAGTAA-TT
大头金蝇	GATTTACGTACTTTATTAATAAATAACATAAATATTAATAACCTACTAGAACAGTAA-TT
棕尾别麻蝇	GATTTACATATTTGTTAAATAATAATATAACTATTAAATWACCGACTAAAACTGTAA-TT
肥须亚麻蝇	GATTTACATATTTGTTAAATAATAGTATAATTATTAATAACCTACTAAAAACAGTAA-TT
家蝇	GATTTACATACTTATTAATAAATAATGTTGATATTAAATATCCTACTAAAAATAGTAAAT

巨尾阿丽蝇	ATTACTAAAATTAAGTGCCTGGT-CATGAAAAAGACTAAT
丝光绿蝇	ATTACTAAAATTAAGTGCCTGATTGATGAAAAAGATTAT-
大头金蝇	ATTACTAAAATTAAGTGCCTGGT-CCTGGAACAAGATTAA
棕尾别麻蝇	ATTACTAAAATTAATAAGTATGAT-CATGAAAAAGATTAA
肥须亚麻蝇	ATTACTAAAATTAATAAGTATGAT-CATGAAAAAATTAT-
家蝇	ATAATTAATAATAAGTGTATGAT-CATGAAAGAAATTAA

图 1.1 六种尸食性蝇类 COII 片段序列比对

Fig 1.1. Alignment of six species of carrion-breeding flies mtDNA COII segment sequences

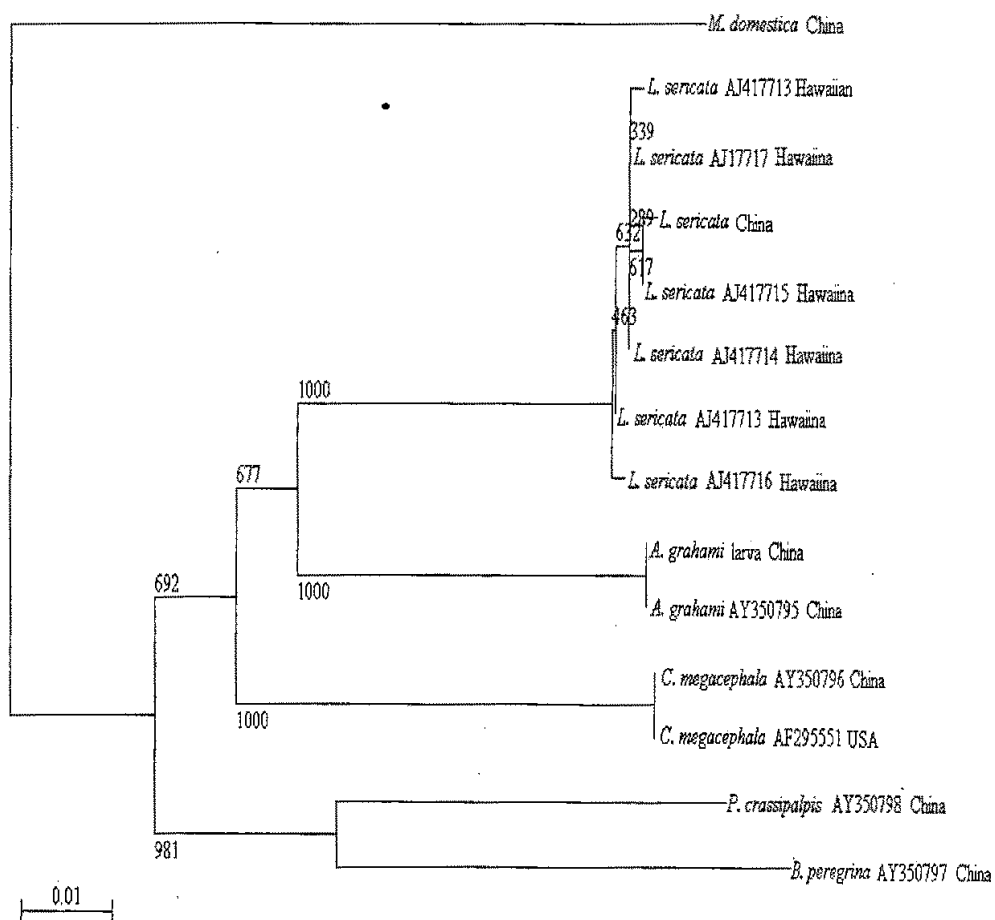


图 1.2 六种尸食性蝇类基于 COII 序列的 NJ 树。

Fig 1.2 The neighbor-joining (NJ) tree based on the COII sequence data of six species of carrion-breeding flies

第二章 双向凝胶电泳图谱用于常见尸食性蝇类初孵幼虫的鉴别

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)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℃培养箱中果酱瓶内, 以新鲜瘦猪肉饲养。培养箱温度为 24℃, 光照时间 12h。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 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)。尔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 as 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 kDa。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, 每个数据由二位数据(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进入方程和逐步判别分析, 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 2.1。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 2.2。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 2.3, 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 $x_{11}, x_{13}, x_{14}, x_{17}, x_{24}, x_{30}, x_{31}, x_{39}, x_{42}, x_{45}, x_{46}, x_{50}, x_{52}, x_{56}$ 。

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 2.4。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,而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2.3、图2.4)。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应用(Sperling, 1994; Beneck, 1999; Malmgren 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。

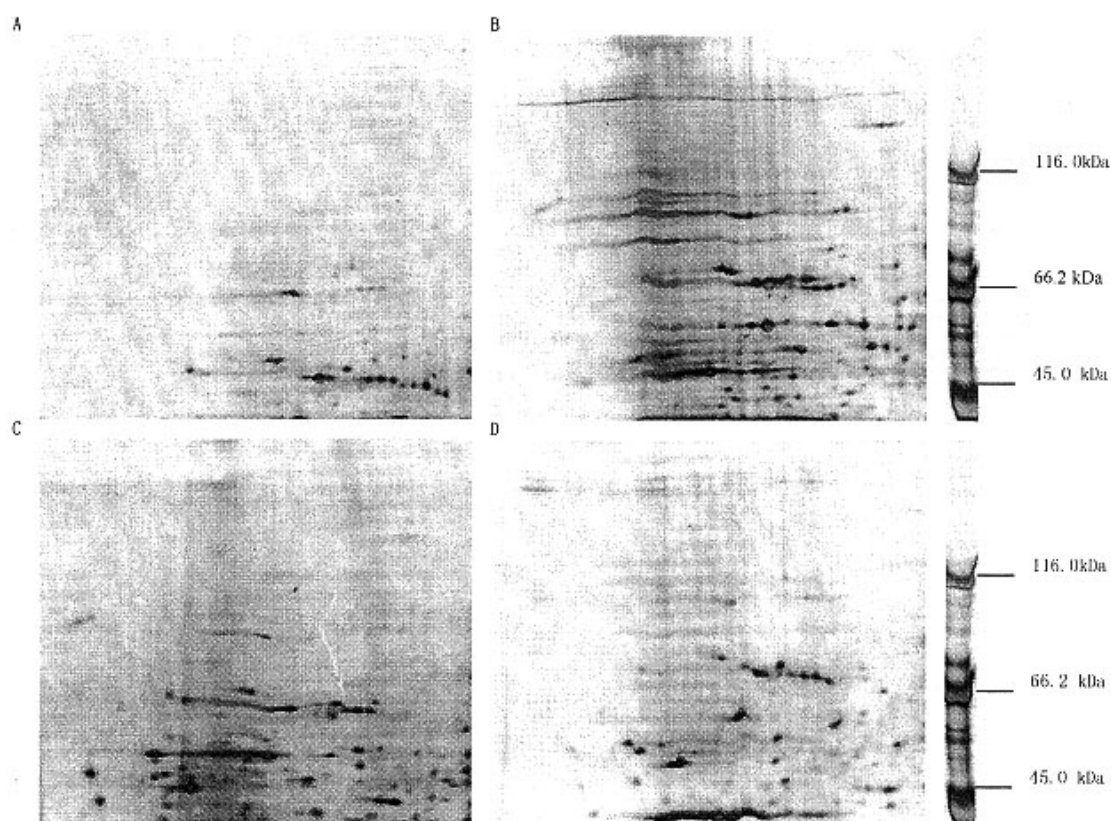


图 2.1 4 种尸食性蝇类初孵幼虫蛋白质组双向电泳图谱

A: 肥须亚麻蝇; B: 巨尾阿丽蝇; C: 大头金蝇; D: 棕尾别麻蝇

Fig 2.1 Two-dimensional gel electrophoresis fingering map for four species of carrion-breeding flies neonate larvae

A: *Parasarcophaga crassipalpis*; B: *Aldrichina grahami*;

C: *Chrysomya megacephala*; D: *Boettcherisca peregrina*

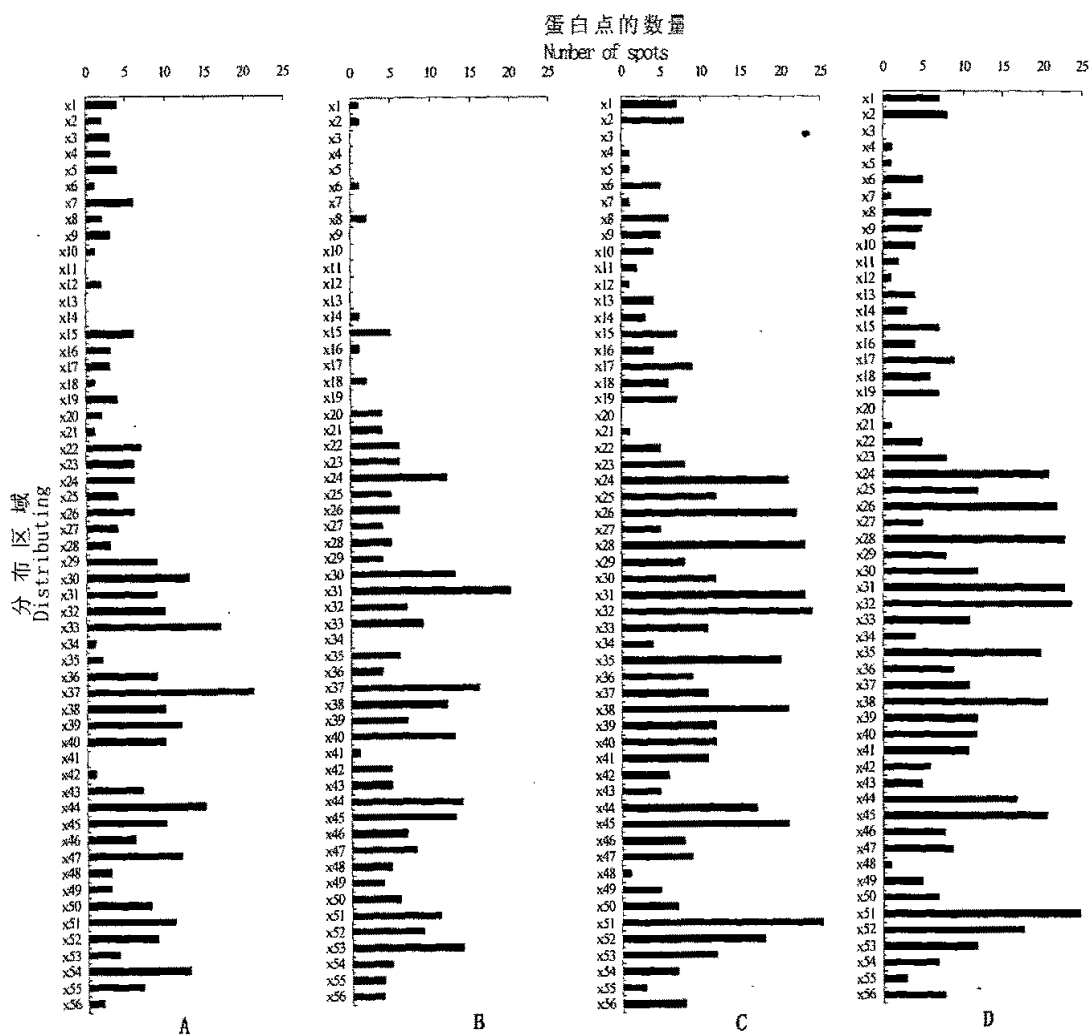


图 2.2 4 种尸食性蝇类初孵幼虫蛋白质组双向电泳点的分布比较

A: 肥须亚麻蝇; B: 巨尾阿丽蝇; C: 大头金蝇; D: 棕尾别麻蝇

Fig 2.2 Comparison of spots distribution of two-dimensional gel electrophoresis fingerprint map for four species of carrion-breeding flies neonate larvae

A: *Parasarcophaga crassipalpis*; B: *Aldrichina grahami*;

C: *Chrysomya megacephala*; D: *Boettcherisca peregrina*

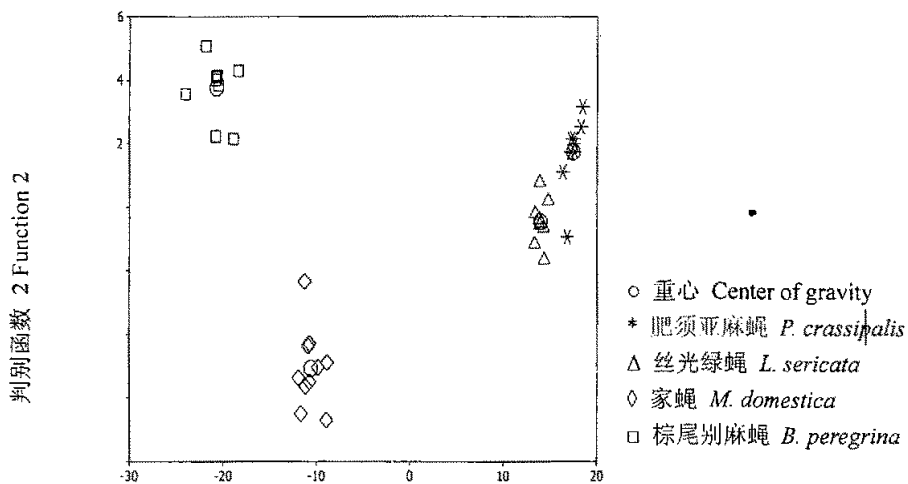


图 2.3 四种蝇类初孵幼虫蛋白特征在判别函数 1 和判别函数 2 二维空间上的分布
(所有变量均进入自变量)

Fig 2.3 Early larvae protein spots of four species of flies distributing in planar space
(All the variable as independent variable)

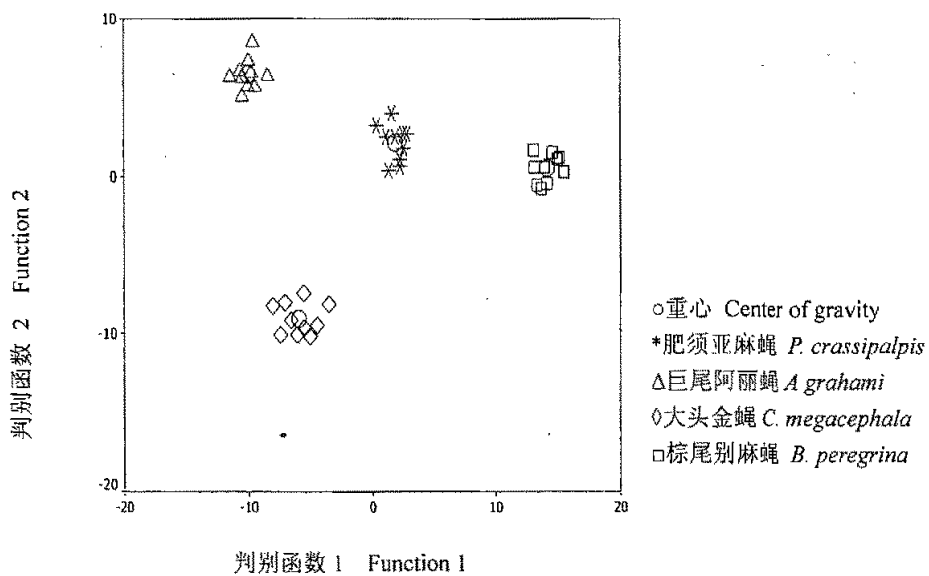


图 2.4 4 种蝇类初孵幼虫蛋白特征在判别函数 1 和判别函数 2 二维空间上的分布 (逐步判别)

Fig 2.4 Protein spots of neonate larvae of four carrion-breeding fly species distributed in planar space
(stepwise discrimination)

第三章 巨尾阿丽蝇离食期幼虫肠道内容物的 DNA 检测

在世界范围内,昆虫作为死亡时间推断的因子应用日益广泛。但是在实际案例中,我们有时会遇到这样的案例,收集蝇蛆时它们散落于尸体的附近。因为蝇蛆常常也能在尸体附近的其他食物中聚集滋生(Wells *et al.*, 2001)。所以在应用昆虫的生长发育于推断死亡间隔时间时必须考虑到蝇蛆食物来源的问题(Wells, 2001; 李凯, 2003; Camposso *et al.*, 2005)。而且在法医调查中已经证明了蛆虫嗉囊内容物 DNA 检测的作用(Wells, 2001)。到目前为止,人们已经能从蝇类幼虫体内检测到人类肌肉(Wells *et al.*, 2001; Liniville *et al.*, 2004; Zehner *et al.*, 2004; DiZinno *et al.*, 2002)和精液的 DNA,以及从蚊子或阴虱血餐(blood meal)中检测到血液的 DNA(Replogle *et al.*, 1994; Lord *et al.*, 1998; Mumcuoglu *et al.*, 2004)。所有这些研究表明鉴别食物来源对于法医学调查是有意义的。

当时究竟人类的 DNA 在离开食物的昆虫体内经过多少时间被消化至无法检测,目前还没有翔实的报道。当我们检测不到昆虫体内人类的 DNA 时,那么是否就可以下结论该虫没有在现场尸体上取食呢?答案是否定的,因为经过较长时间的消化后可能才导致检测不到 DNA。因此,必须知道昆虫肠道内能够维持 DNA 的时间长短。本文主要就这个问题展开研究。

哺乳动物线粒体 DNA(mt DNA)在个体、种群和种类及分类方面起着重要作用。近年来,猪的线粒体基因组全序列已经测出,其中 mtDNA 细胞色素 b(cyt b)常常被用于种群的识别(Jiang *et al.*, 2001)。另外,考虑到猪是法医昆虫学基础研究方面的最常用模式动物,所以本文特选择猪 cyt b 作为食物检测的信号。

1 材料与方法

1.1 昆虫的饲养

巨尾阿丽蝇 *Aldrichina grahami* (Aldrich)幼虫自野外诱集获得,建立实验室种群。成虫饲养见第一章。

待成虫产卵后,取 200 粒卵至果酱瓶并加入 50 g 新鲜猪肉片,然后放入恒温培养箱。待其孵化后,初孵幼虫转移至过量的猪肉果酱瓶内。根据先前的结果,每天加入果酱瓶的猪肉为每头幼虫 0.5 g 让它们充分发育。实验分别在 5 个温度(16、20、24、28 和 30℃)下进行。

1.2 取样和解剖

在之前的研究中，曾经测定过 50% 幼虫到达最大体长的时间，达到最大提倡后之后幼虫就停止取食进入离食期（王江峰等，2002）。因此，在本文中，当达到这一时间后，就将幼虫与食物分离，每隔 6 小时从中取出 10 头幼虫直到 48 h 后。蝇蛆在 0.9%NaCl 中清洗数次，并在含 DNA 酶的溶液中清洗表面（Linville & Wells, 2002），蒸馏水冲刷后用吸水纸干燥。

解剖时，幼虫置于冰冷的 100 mM Tris-Cl (pH 7.0) 中，切去第九腹节，然后沿虫体顶端剪开表皮并保持嗦囊完整。嗦囊取出后置离心管中，其余组织弃去。离心管置 -70℃ 冰箱保存备用。

1.3 DNA 提取

单个嗦囊用通用 DNA 试剂盒（Classic Genomic DNA Isolation Kit, 上海生物技术有限公司）抽提总 DNA，最后溶于 30 μ l 无菌水中。同时分别提取成虫和刚进入离食期的整个幼虫的 DNA 作为对照。

1.4 PCR 扩增与测序

PCR 扩增用引物采用猪 cyt b 基因特异性引物：

H0616 --- 5' - TATTCCTGCAGAAACCGGAT - 3'

H1106 --- 5' - AGGTTGTTTTTCGATGATGCTAG - 3'

扩增片段的大小为 491 bp。PCR 反应体系为 20 μ l，其中含 DNA 6 ng，其余试剂采用 Ready-to-Use PCR 试剂盒（BBI）。PCR 反应条件如下：

94℃ 3 min，55℃ 45 s，72℃ 45 s，扩增 35 个循环；72℃ 延伸 5 min。PCR 反应结束后，取 PCR 产物 10 μ l，1% 的琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果并拍照。

PCR 产物纯化和测序见第一章相关部分。

1.5 数据分析

我们用改进的 logistic 模型模拟了食物检测概率随时间变化的情况，采用 bootstrap 估计标准误和 R^2 值用于比较模型的效果。统计软件采用 SPSS 13.0，作图采用 Origin 7.0。

2 结果

2.1 猪 *cyt b* 基因和组织确定

在应用昆虫学证据时首先得确定蝇类幼虫与尸体得关系，以免侦查方向出现错误。图 3.1 清楚地表明通过蛆虫总 DNA 的 *cyt b* 基因检测，能够确认其食源（猪）。

图 3.1 表明目的 DNA 也能从解剖的嗦囊中清晰的检测到。当时 DNA 仅仅能从喂食了猪肉的蛆虫体内检测到，而喂食了麦麸的蛆虫体内则检测不到相应的目的片段。扩增到的片段纯化后经测序后，与 GenBank 上相应的序列进行了比对，序列相似性达到 97%。Cyt b 基因不仅能在嗦囊中检测到也能从整个虫体中检测到(图 3.2)。当然图 3.2 也表明，前者的 PCR 产物比后者的 PCR 产物更明显。因此，在下面的试验中我们采用嗦囊作为我们研究的对象。

2.2 离食期后 PCR 检测概率随时间的变化

非线性回归曲线表明：随着巨尾阿丽蝇幼虫消化时间的延长 *cyt b* 基因可检测到的概率随之下降（图 3.3）。在这里改进的 logistic 曲线方程为： $y = \exp(a+b*x)/(1+\exp(a+b*x))$ 。

图 3.3 表明，几乎所有的样品在幼虫进入离食期 12 h 内都能检测到。而且在恒温下，其最长可检测的时间范围从 32℃ 的 24 h 增加到 16℃ 的 42 h (见图 3.4)。

3 讨论

昆虫学证据不仅可以用来推断死亡间隔时间，本文的结果表明还可以用来鉴定蝇蛆体内的脊椎动物。Campobasso 等（2005）亦认为蛆虫体内的 DNA 检测是适合用于检测其食物来源的。序列测定的结果也显示了嗦囊或者蛆虫的 PCR 扩增与宿主 DNA 的 PCR 扩增结果是一致的，Wells 等（2001）的序列测定也与人类 DNA 相关靶标序列相符。然而图 3.2 的结果却告诉我们，在检测蛆虫体内的宿主 DNA 时，应对其组织进行解剖以富集目标 DNA，这样就能够获得更精确的结果。当然在刑事侦查中，如法医缺乏解剖昆虫的经验时，亦可采用整个虫体作为 DNA 来源对宿主进行鉴定。

最近国外的研究结果认为，宿主 mtDNA 在 3 龄正在取食期的幼虫更容易获得，而早期的幼虫和离食期的扩增则比较难。在我们的实验中，所有的试虫都是处于三龄，其中的 0 h 试虫刚刚处于离食期的边缘，这也与前人的结果相吻合。但是在他们的研究大都局限于对昆虫最后一餐的鉴定分析，而对蝇类幼虫进入离食期后究竟过多久不能被检测到却缺乏系统的研究，知道最近才得到若干数据并不十分充分的证据。所以我们对可检测时间的确认对于宿主 DNA 的鉴定提供了更为有力的基础。

另外，昆虫肠道的宿主 DNA 检测在国外已经在多个种类中开展，如蝇类(Wells 等, 2001)、

甲虫 (DiZinno 等, 2002) 和阴虱 (Mumcuoglu 等, 2003)。但是他们的研究偏重于不同虫子之间的比较, 几乎没有考虑环境因子对可检测时间的影响。图 3.4 清楚的表明, 随着温度的升高, 可检测时间则随之下降。其最大可检测时间当 28℃ 时处于最低值。因此, 在实际应用中还应该考虑到温度对可检测时间的影响。

总而言之, 指明了宿主 DNA 在肠道内随时间变化及其受温度影响的明确, 为法医昆虫学的研究了一个新的方向。

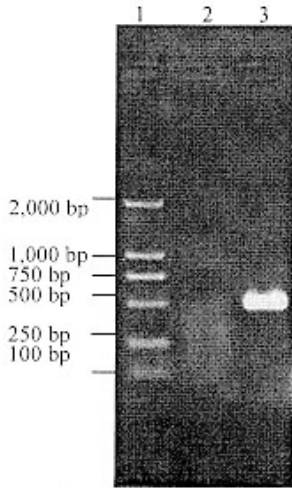


图 3.1 巨尾阿丽蝇和猪的 *cyt b* 基因扩增

Fig 3.1 Cyt b gene exaction from *A. grahami* and pig.

Lanes were: marker (1); fly larva crop without pork feeding (2); pig muscle (3)



图 3.2 嗦囊和整个蛆虫体内 *cyt b* 基因的检测比较

Fig 3.2 Cyt b gene exaction from the crops and maggots. Lanes were: pig muscle as control (1); crop (2); whole fly larva (3)

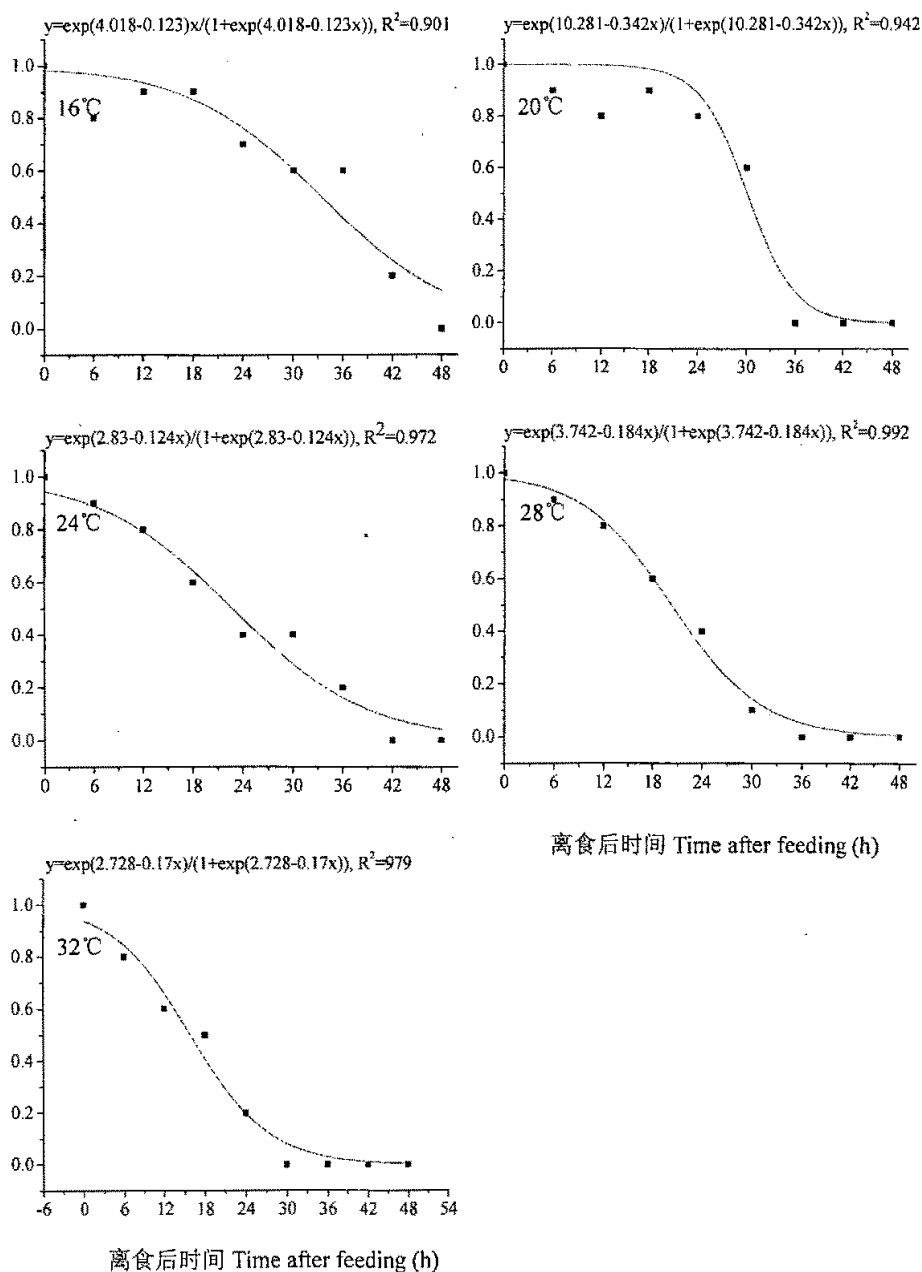


图 3.3 DNA 可检测概率随时间变化的曲线模拟图。

回归方程的形式为 $y = \exp(a + b \cdot x) / (1 + \exp(a + b \cdot x))$ 。参数的估计根据 100 次 bootstrap 自举验证。

Fig 3.3 Fitted relationship between detectability of the DNA and time after feeding under different temperatures. Regression equations for detection of hosts DNA was

$y = \exp(a + b \cdot x) / (1 + \exp(a + b \cdot x))$. Parameter estimate was based on 100 bootstrap iterations.

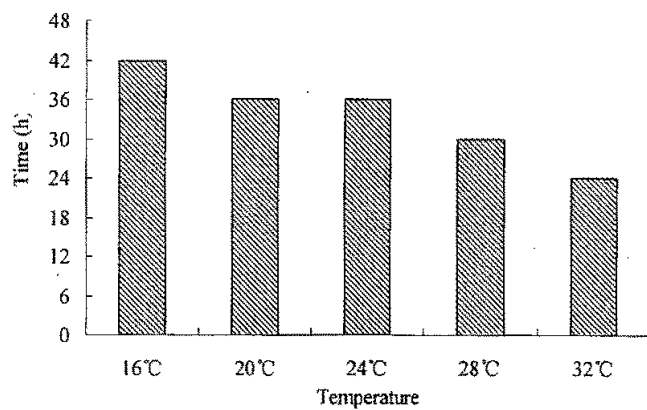


图 3.4 巨尾阿丽蝇幼虫离食期后食物地最大可检测时间

Fig 3.4 Maximal detecatable time after postfeeding of *A. grahami*

第四章 四种尸食性蝇类幼期蛋白质、脂类、糖含量和体重随发育变化的时间特征

尸食性蝇类发育生物学在死后间隔时间推断中有着重要地位，在死后间隔时间大于 3d 时尤其如此(Catts & Haskell, 1990)。目前在推断蝇类幼期日龄方面有一些形态学指标，但是这些形态学指标变化不明显且仅能被少数专家所掌握。因此一种简便的可为广大法医工作者快速掌握应用的方法，有待于开发。从检验学的角度，生物体内生化成分的变化可以为我们指示某些表现无法显示的现象。昆虫在发育过程中，其体内各种组分的含量也会不断发生变化。其中一些有规律变化的物质可以用来进行年龄分级。

昆虫年龄分级的方法主要是基于动物本身在生长发育过程中有规律发生的 3 类变化：第一，由于生长发育及各种活动所引起的机体外部表现形态的变化，如体长、体重的增长，表皮生长层的积累等；第二，机体内各种组成成分含量的变化，如表皮碳水化合物组成的变化、蝇类成虫头壳中蝶啶含量的积累等；第三，基于机体组织内部各种理化性质的变化。本文主要对第 2 类特征即机体内各种组成成分如蛋白质、糖类、脂类含量和体重的变化在推断尸食性蝇类幼期日龄中的应用进行初步的研究。

1 材料与方法

1.1 供试虫源与取样方法

棕尾别麻蝇、肥须亚麻蝇、丝光绿蝇、巨尾阿丽蝇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 内所产卵接入培养箱中果酱瓶内，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。幼虫一般于产卵后 1~2 d 开始取样，此后每隔 24 h 取样一次，直至化蛹。蝇类的日龄从产卵始计。样品采集后，用蒸馏水清洗数次，滤纸吸干，置 -70℃ 冰箱保存备用。

1.2 样品粗提液制备

每日龄虫各取 10 头，称重后分别在液氮中充分研磨后加入 500 μ l PBS(pH 7.4)溶液，12,000 rpm 离心 10 min，取上清即为粗提液。

1.3 蛋白质含量的测定

取粗提液，根据 Bradford 法(1976)测定蛋白质含量，标准曲线用 0.5 mg/ml 牛血清蛋白制作。

1.4 可溶性总糖的测定

取粗提液，加入 1/4 体积的 50% 磷基水杨酸溶液，12,000 rpm 离心 10 min，取上清即为糖提取液。

总糖的定根据硫酸蒽酮法（冯慧，1989），糖提取液 50 μ l 加入蒸馏水补足到 400 μ l，加入 2 ml 0.2% 蒽酮硫酸试剂混合均匀，沸水浴 10 min，测 620 nm 处 OD 值，以葡萄糖为标准溶液。

1.54 海藻糖的测定

海藻糖的测定基本采用蒽酮比色法（冯慧，1989），糖提取液加 0.5 ml 的 0.15 N 硫酸，沸水浴 10 min，冷却，再加入 0.5 ml 30% KOH，沸水浴 10 min，冷却，用水补足到 2 ml，加入 4 ml 蒽酮试剂（冰浴）；沸水浴 10 min，冷却，测 OD₆₂₀ 值并根据海藻糖标准曲线计算海藻糖含量。

1.5 脂类含量的测定

每日龄虫各取 10 头，称重后分别加入 200 μ l PBS，加入 750 μ l 氯仿/甲醇（v/v 1:2），剧烈振荡 1 分钟，加入 250 μ l 氯仿振荡 1 分钟，加入 250 μ l 水振荡 1 分钟，离心 5000 转 5 分钟，弃上相，取出下相液为脂类提取液备用。

取样品脂提取液 25 μ l，蒸馏水补足至 100 μ l，加入 500 μ l 氯仿，混匀室温静止 10 分钟，加入 0.5 ml 浓 H₂SO₄，沸水浴 10 min，取出冷却至室温，加入 1 ml 芳草醛溶液（13 mM 芳草醛溶于 14 M 磷酸中），显色 30 min，测 OD₅₄₇，并以 2.5 mg/ml 胆固醇做标准曲线（Nakamatsu & Tanaka, 2003）。每处理重复 6 次，以胆固醇作标准曲线。

1.6 数据分析

数据利用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析，作图采用 Origin 7.0。

2 结果

2.1 体重与日龄的关系

24℃ 下四种尸食性蝇类幼虫和蛹体重随日龄变化趋势如图 4.1 所示。从图中可见，不同

蝇类幼虫体重均随着发育都至 3 日龄达到最大体重,之后随着日龄增大而逐渐降低。蝇类幼虫的体重变化呈 S 型,可以用改进的 Logistic 曲线拟合体重和日龄的关系, χ^2 检验表明,各曲线拟合方程是显著适合的。

不同种类蝇类体重在蛹期也呈逐渐下降趋势,但体重减少的趋势不明显,其与日龄的关系可以线性关系拟合, F 检验表明,与日龄呈极显著相关 ($P<0.01$)。

2.2 蛋白质含量与日龄的关系

24℃下四种尸食性蝇类幼虫和蛹蛋白质随日龄变化趋势如图 4.2 所示。从图中可见,不同蝇类幼虫蛋白质随着发育都在 3 日龄后变化不明显。蝇类幼虫的蛋白质含量变化呈 S 型,可以用改进的 Logistic 曲线拟合蛋白质和日龄的关系, χ^2 检验表明,各曲线拟合方程是显著适合的。

不同种类蝇类蛋白质含量在蛹期也呈逐渐下降趋势,其与日龄的关系可以线性关系拟合, F 检验表明,与日龄呈极显著相关 ($P<0.01$)。

2.3 可溶性总糖含量与日龄的关系

24℃下四种尸食性蝇类幼虫和蛹总糖含量随日龄变化趋势如图 4.3 所示。从图中可见,不同蝇类幼虫总糖随着发育在 4 日龄后变化不明显。蝇类幼虫的总糖含量变化呈 S 型,可以用改进的 Logistic 曲线拟合总糖和日龄的关系, χ^2 检验表明,各曲线拟合方程是显著适合的。

不同种类蝇类总糖含量在蛹期也呈逐渐下降趋势,其与日龄的关系可以线性关系拟合, F 检验表明,与日龄呈极显著相关 ($P<0.01$)。

2.4 海藻糖含量与日龄的关系

24℃下四种尸食性蝇类幼虫和蛹海藻糖含量随日龄变化趋势如图 4.4 所示。从图中可见,不同蝇类幼虫海藻糖随着发育呈现不同的变化趋势,达到最大值的日龄不尽相同。其蝇类幼虫的海藻糖含量变化呈 S 型,可以用改进的 Logistic 曲线拟合海藻糖和日龄的关系, χ^2 检验表明,各曲线拟合方程是显著适合的。

不同种类蝇类海藻糖含量在蛹期也呈逐渐下降趋势,其与日龄的关系可以线性关系拟合, F 检验表明,与日龄呈极显著相关 ($P<0.01$)。

2.4 脂类含量与日龄的关系

24℃下四种尸食性蝇类幼虫和蛹脂类含量随日龄变化趋势如图 4.5 所示。从图中可见,

不同蝇类幼虫脂类含量随着发育在 4 日龄左右到达最大值。其蝇类幼虫的脂类含量变化呈 S 型，可以用改进的 Logistic 曲线拟合脂类和日龄的关系， χ^2 检验表明，各曲线拟合方程是显著适合的。

不同种类蝇类脂类含量在蛹期也呈逐渐下降趋势，其与日龄的关系可以线性关系拟合，F 检验表明，与日龄呈极显著相关 ($P < 0.01$)。

3 讨论

Wells 等(1995) 根据体重对螺旋蛆蝇 *Cochliomyia macellaria* 日龄推测进行了研究。他们的研究表明蝇蛆孵化后，随着日龄增加其体重急速上升，然后在离食期前后基本稳定。这与我们的结果是相符的，四种蝇类都在 3 日龄左右进入离食期，而后再在幼虫期其体重基本稳定，在蛹期随着水分的少量蒸发，体重也有轻微的下降。这个过程在幼虫期基本上是呈 S 型，可以用改进的 Logistic 曲线拟合，而且相关系数很高；在蛹期虽然也可以用线性方程拟合，但相关系数较低。在推断蝇类日龄时，在幼虫 3 日龄以前由于体重变化显著，日龄的预测比较准确，而在离食期后，由于没有太大的变化，在应用时能够给出一个预测日龄的较大范围。

昆虫在发育过程中，其体内各种组分的含量也会不断发生变化。其中一些有规律变化的物质可以用来进行年龄分级。在本章的研究中，选择了蛋白质含量、糖类和脂类等生物体的主要成分来对蝇类的日龄进行鉴别。同样的，这些主要生化组分随着蝇类初期的发育快速增加后，会进入一个相对稳定的时期，然后随着蝇类代谢的增加，这些能量物质会逐渐被消耗，因而又有一个相对下降的过程。但是其下降速度在不同的发育是不同的，如从幼虫期到蛹期的变态过程中，变化是剧烈的，到了蛹期之后，又进入相对稳定的时期，到了蛹期末期，这些成分的变化又相对加快，而这些变化与前人的研究结果是类似的(Wheeler *et al.*, 1992; Nestel *et al.*, 2003; Nestel *et al.*, 2005)。

在所有这些生化组分中，脂类含量是最值得关注的。从图 4.16-4.20 中我们可以看出，在三日龄后，幼虫脂类含量的变化也是明显的，由此可见，在蝇蛆最难以区分日龄的幼虫末期，脂类含量能够发挥独到的作用。而其他组分也能够日龄推断中，起到辅助的作用。

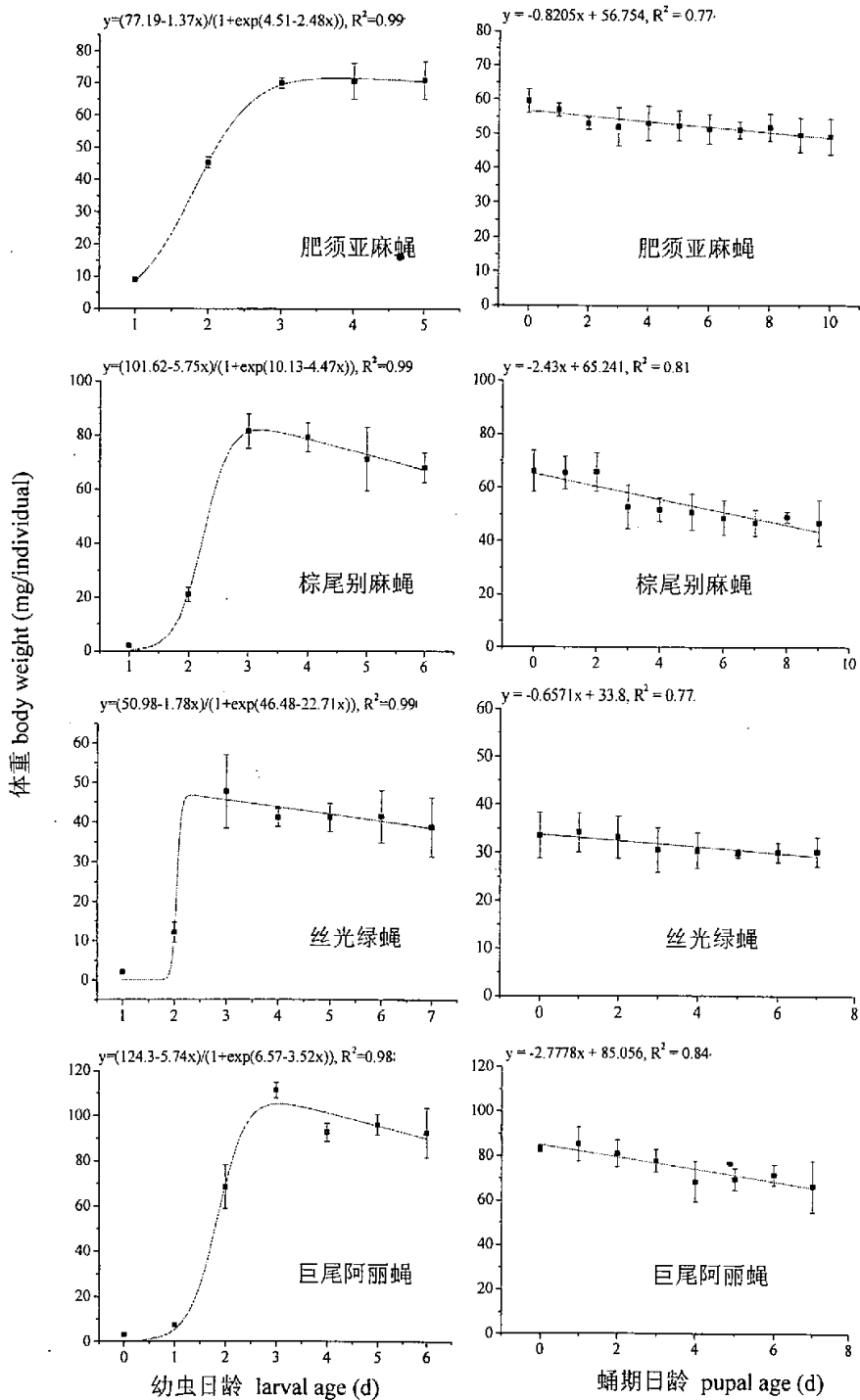


图 4.1 四种蝇类幼期体重与日龄的关系

Fig 4.1 Relationship between body weight of larvae and pupae of four species of flies and age

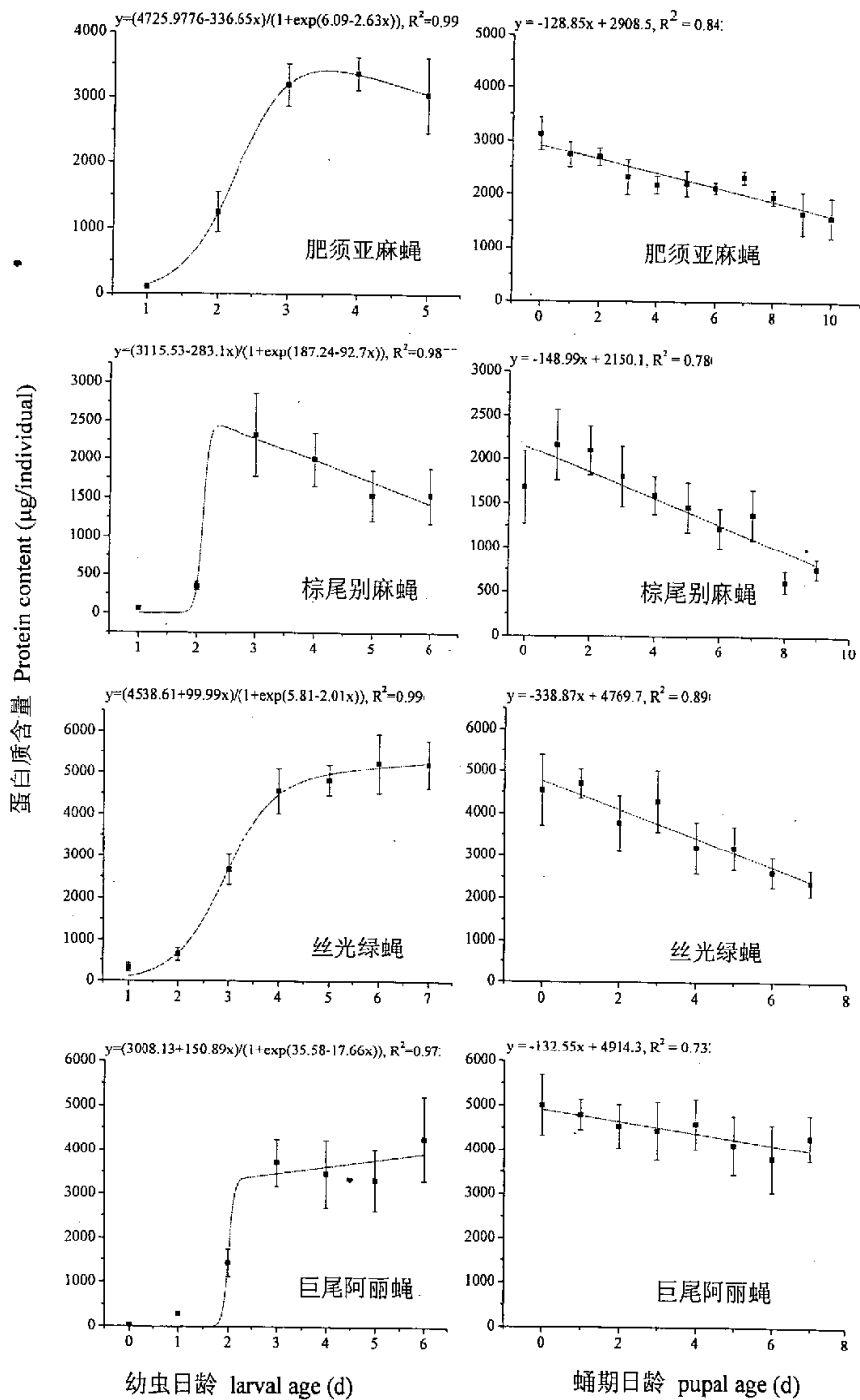


图 4.2 四种蝇类幼期蛋白质含量与日龄的关系

Fig 4.2 Relationship between larval protein content and pupae of four species of flies and age

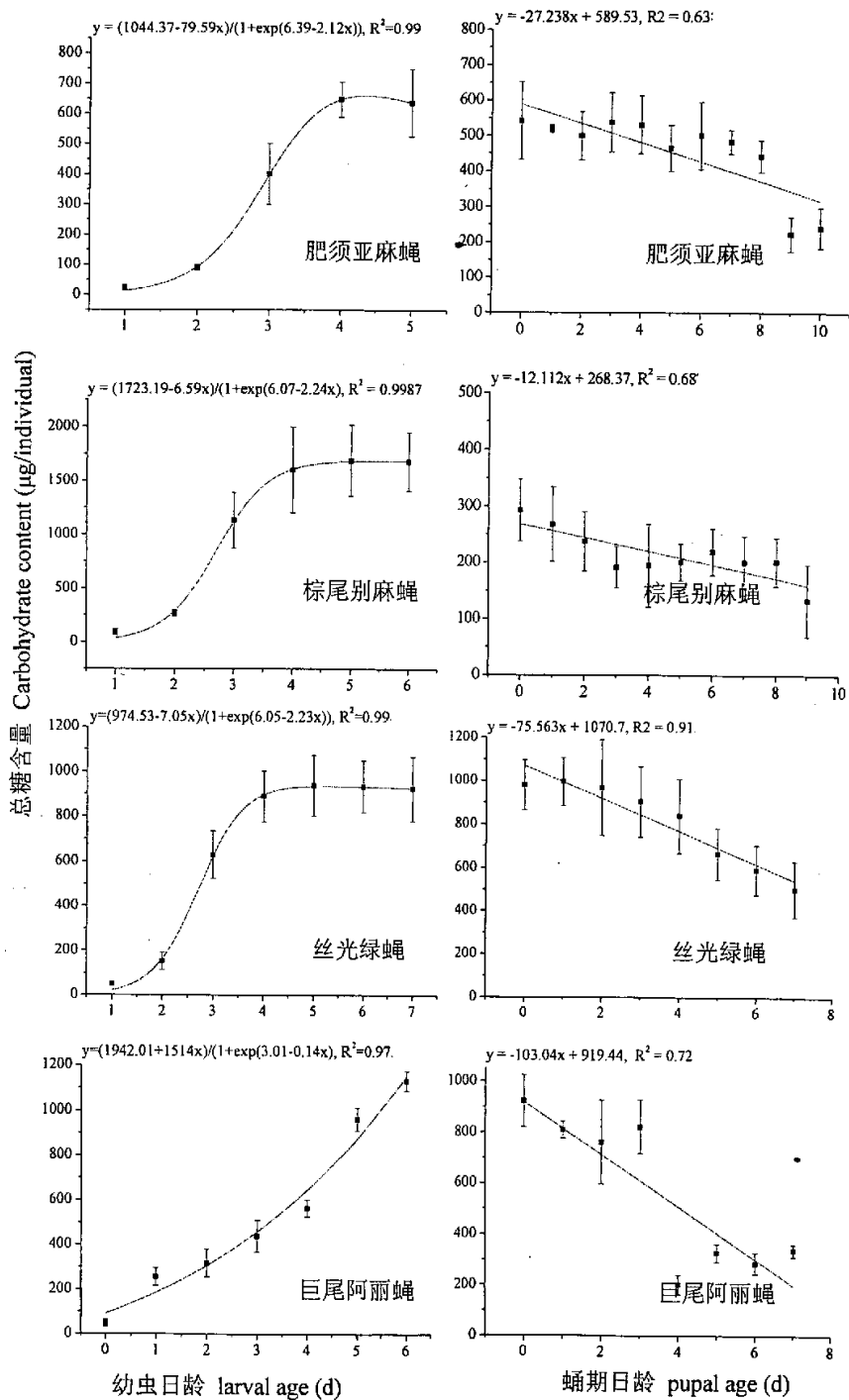


图 4.3 四种蝇类幼期糖类含量与日龄的关系
Fig 4.3 Relationship between larval carbohydrate content and pupae of four species of flies and age

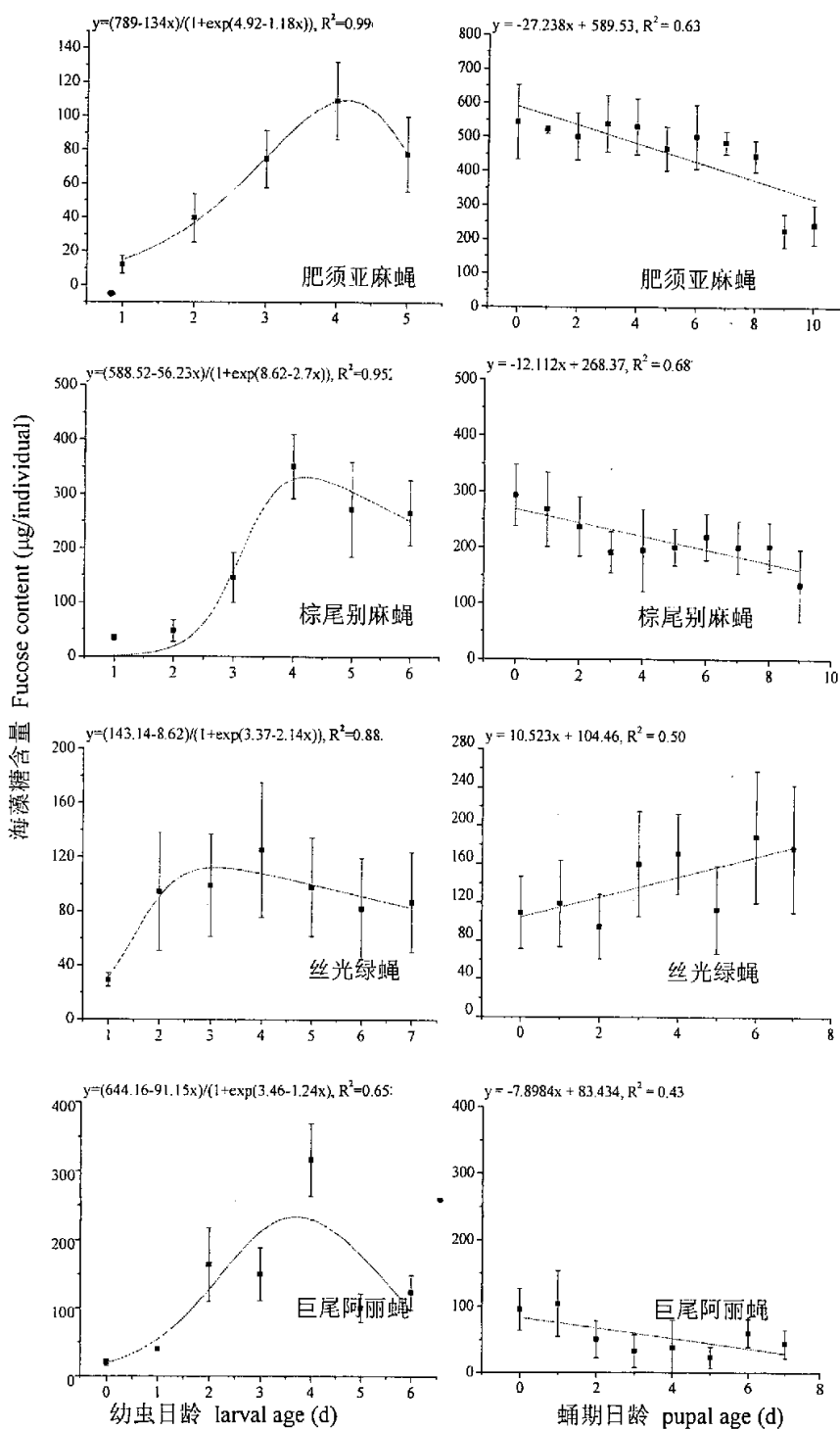


图 4.4 四种蝇类幼期海藻糖含量与日龄的关系

Fig 4.4 Relationship between fucose content of larvae and pupae of four species of flies and age

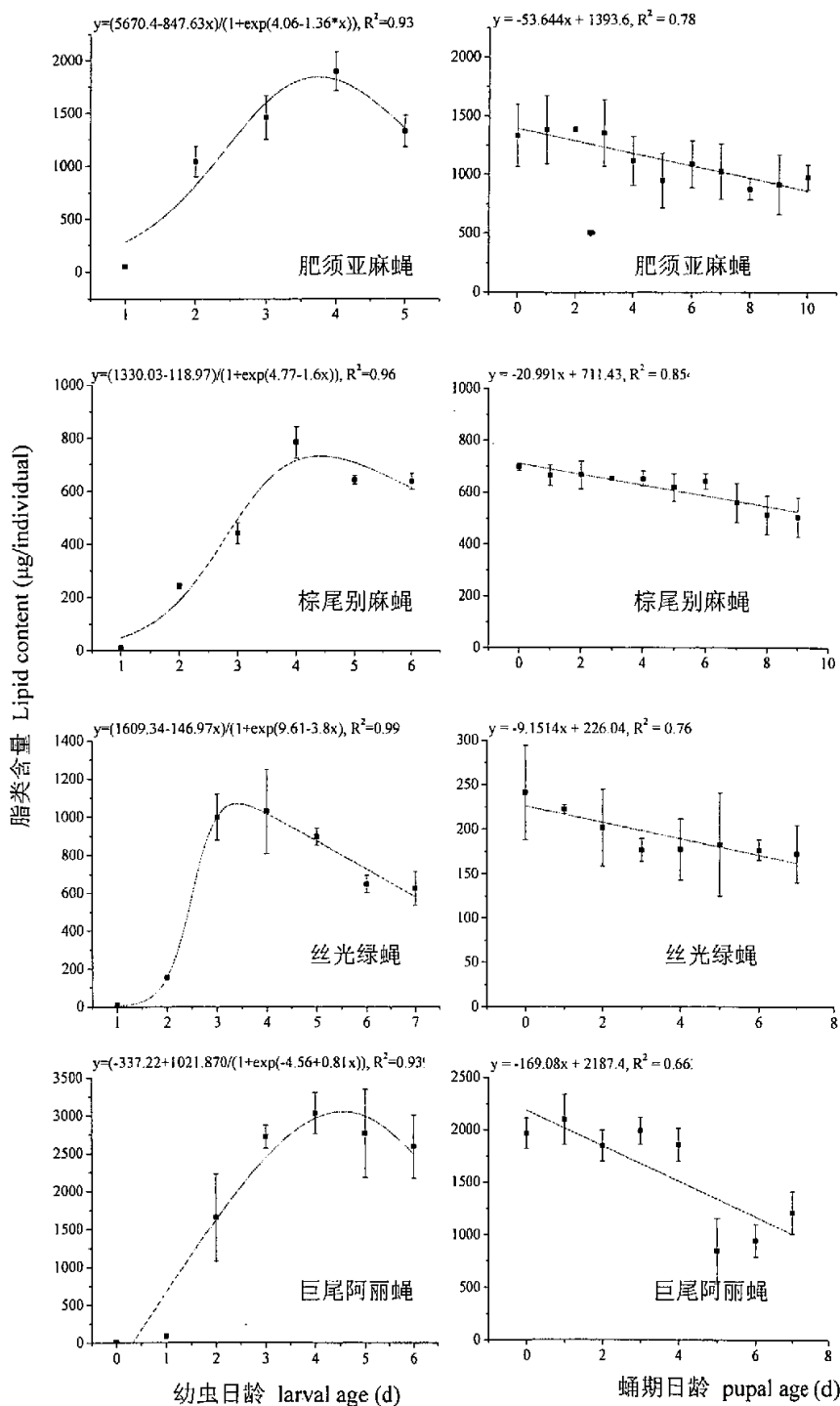


图 4.5 四种蝇类幼期脂类含量与日龄的关系

Fig 4.5 Relationship between lipid content of larvae and pupae of four species of flies and age

第五章 温度对蝇类幼期蛋白质、脂类和总糖及体重变化的影响

尸食性蝇类的生长发育受到多种外界因素影响,其日龄指标的时间动态也相应的受这些因素的影响。阐明这些因素的影响是对尸食性蝇类进行日龄分级的前提条件之一。

众所周知,温度与生物生长发育速率之间呈 S 型曲线关系,即在低温和高温区域抑制生长发育,适温区域随温度上升而加快。在法医昆虫学领域研究温度对生长发育的影响,目前主要可以分为两个方面:一是温度对各昆虫发育速率的影响;二是温度对各日龄指标的影响。涉及第一个方面研究资料是相当丰富的。而温度对各日龄特异性指标的影响,则多是研究不同温度下,两个指标即蝇类幼虫体长(Byrd & Bultler, 1996, 1997, 1998; 胡萃, 2000; Byrd & Allen, 2001)和体重时间动态的研究。由此,建立起较多温度下日龄指标与日龄的关系模型,在实践中,往往可直接选用与实验温度相差最小的模型。

蛋白质、糖类、脂类等生化组分在蝇类发育的变化也已经有相当的工作,(Agrell *et al.*, 1973; D'Costa *et al.*, 1966; Nestel *et al.*, 2003; Nestel *et al.*, 2005),但尚没有揭示其与温度关系的模型。针对这一问题,本章探讨不同恒温下,四种常见尸食性蝇类幼期上述生化成分积累的规律,旨在为其在日龄推断中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

棕尾别麻蝇 *Boettcherisca peregrina* (Robineau-Desvoidy)、肥须亚麻蝇 *Parasarcophaga crassipalpis* (Macquart)、丝光绿蝇 *Lucilia sericata* (Meigen)巨尾阿丽蝇 *Aldrichina grahami* (Aldrich)来源同第四章,试验温度设为 16、20、24、28 和 32℃,计 5 个温度,不同日龄虫取样方法同第四章,每日龄取 20 头虫。

1.2 生化测定

体重、蛋白质、总糖和脂类的考查方法同第四章。

1.3 数据分析

数据的统计分析采用 SPSS 13.0 软件,作图用 Origin 7.0 软件处理

2 结果

2.1 体重

各温度下幼虫体重的时间动态如图 5.1-5.4 所示 (24℃见第四章)。结果表明,各温度下,幼虫体重在幼虫期初期随着日龄增加而显著增加,到达幼虫体重的最大值后,在此后各日龄中体重稍下降。但幼虫体重达到最大值的时间随着温度的降低而延长。用改进的 Logistic 曲线对不同种类不同温度下的体重与日龄关系进行拟合, χ^2 检验显示,各个回归方程均显著适合。

各温度下蛹体重的时间动态如图 5.5-5.8 所示 (24℃见第四章)。结果表明,各温度下,体重在蛹初期显著下降,此后各日龄中体重稍下降,置蛹期末期下降加快。用线性方程对不同种类不同温度下的体重与日龄关系进行拟合, F 检验显示,各个回归方程均显著适合。

2.2 蛋白质含量

各温度下幼虫蛋白质的时间动态如图 5.9-5.12 所示 (24℃见第四章)。结果表明,各温度下,幼虫蛋白质含量在幼虫期初期随着日龄增加而显著增加,到达幼虫蛋白质含量的最大值后,在此后各日龄中蛋白质含量稍下降。但幼虫蛋白质含量达到最大值的时间随着温度的降低而延长。用改进的 Logistic 曲线对不同种类不同温度下的蛋白质含量与日龄关系进行拟合, χ^2 检验显示,各个回归方程均显著适合。

各温度下蛹蛋白质含量的时间动态如图 5.13-5.16 所示 (24℃见第四章)。结果表明,各温度下,蛋白质含量在蛹期缓慢下降。用线性方程对不同种类不同温度下的蛋白质含量与日龄关系进行拟合, F 检验显示,各个回归方程均显著适合。

2.3 总糖含量

各温度下幼虫(丝光绿蝇样品不足未测)总糖含量的时间动态如图 5.17-5.19 所示 (24℃见第四章)。结果表明,各温度下,幼虫总糖含量在幼虫期初期随着日龄增加而显著增加,到达幼虫总糖含量的最大值后,在此后各日龄中总糖含量稍下降。另外,随着温度的升高,总糖含量的最大值也增加,而且幼虫总糖含量达到最大值的时间随着温度的升高而缩短。用改进的 Logistic 曲线对不同种类不同温度下的总糖含量与日龄关系进行拟合, χ^2 检验显示,各个回归方程均显著适合。

各温度下蛹总糖含量的时间动态如图 5.20-5.22 所示 (24℃见上一章)。结果表明,各温度下,总糖含量在蛹初期显著下降,此后各日龄中总糖含量稍下降,到蛹期末期下降加快。用线性方程对不同种类不同温度下的总糖含量与日龄关系进行拟合, F 检验显示,各个回归方程均显著适合。

2.4 脂类含量

各温度下幼虫脂类含量的时间动态如图 5.23-5.26 所示 (24℃见上一章)。结果表明,各

温度下, 幼虫脂类含量在幼虫期初期随着日龄增加而显著增加, 到达幼虫脂类含量的最大值后, 在此后各日龄中脂类含量稍下降。但幼虫脂类含量达到最大值的时间随着温度的降低而延长。用改进的 Logistic 曲线对不同种类不同温度下的脂类含量与日龄关系进行拟合, χ^2 检验显示, 各个回归方程均显著适合。

各温度下蛹脂类含量的时间动态如图 5.27-5.30 所示 (24℃见上一章)。结果表明, 各温度下, 脂类含量在蛹初期显著下降, 此后各日龄中脂类含量稍下降, 置蛹期末期下降加快。用线性方程对不同种类不同温度下的脂类含量与日龄关系进行拟合, F 检验显示, 各个回归方程均显著适合。

3 讨论

研究结果表明, 不同温度下, 各个日龄指标在蝇类的生长发育过程中呈现出类似的变化趋势。体重、蛋白质含量、总糖含量和脂类含量在幼虫初期随着幼虫取食量的增大而迅速增加, 随着离食期的到来, 各个指标又逐渐下降, 这与王江峰等 (2001) 对体长的研究结果相一致。它们规律性的变化表明, 这些指标都有应用于蝇类幼虫日龄推断的潜力。

体重在幼虫期先增加后稍微减少的趋势与前人的研究结果基本一致 (Wells 等, 1995)。本文对体重在幼虫期的变化做了曲线拟合, 但 Well 等则画出相应的预测置信区间, 在方法上稍有不同。

本文研究结果显示, 在蛹期蛋白质、糖类和脂类都呈现出明显下降的趋势, 但在蛹的发育过程中又发生较大的波动, 这与 Nestel 等 (2003) 对果蝇的研究结果相一致, 基本趋势是蛹初期下降较快, 到化蛹前有一个平稳过渡或者上升的小峰, 但在羽化前又迅速降低 (蛋白质除外)。这些变化表明, 生化指标应用于日龄推断, 需要对蛹生长发育过程中的机理深入研究, 从而更有效的应用于实践。

各个指标在不同温度下的变化是一个连续的过程, 幼虫以 1 日龄虫为起点, 化蛹前一天幼虫为终点, 指标的变化均可以改进的 Logistic 模型将其模拟出来, 蛹期不同指标的基本变化趋势是逐渐下降, 几乎所有的指标在蛹期前期变化稍慢, 而到蛹期末期则加速下降, 这一过程可用线性方程进行模拟, 在一定程度尚便利了这些指标在死亡时间推断中的应用。在实际应用中只需测出各个指标, 对应于相近的温度, 便可对日龄作出估计。

笔者在测量各个指标的过程中, 发现单个幼虫或蛹的变异程度甚大, 实际工作中需要收集多个虫体, 以便更好的进行推断。

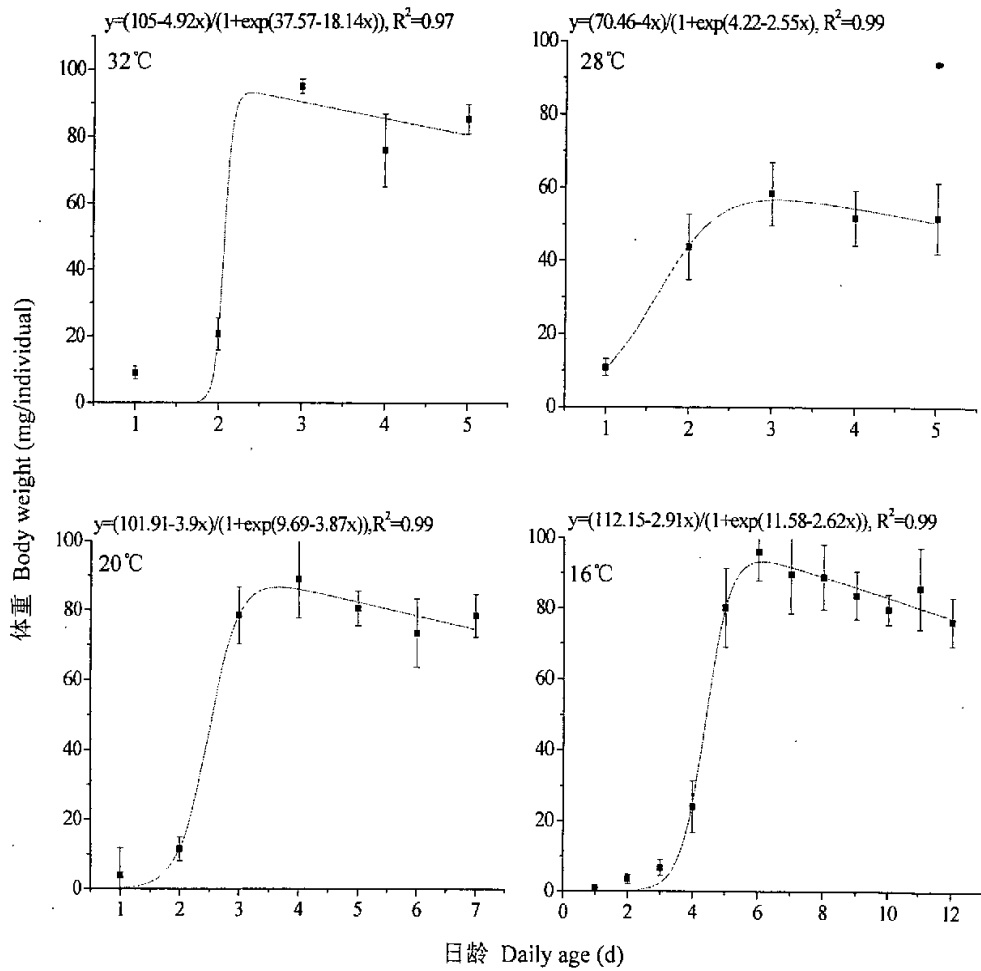


图 5.1 不同温度下下肥须亚麻蝇幼虫期体重与日龄的关系

Fig 5.1 Relationship between larval weight of *Parasarcophaga crassipalpis* under different temperatures

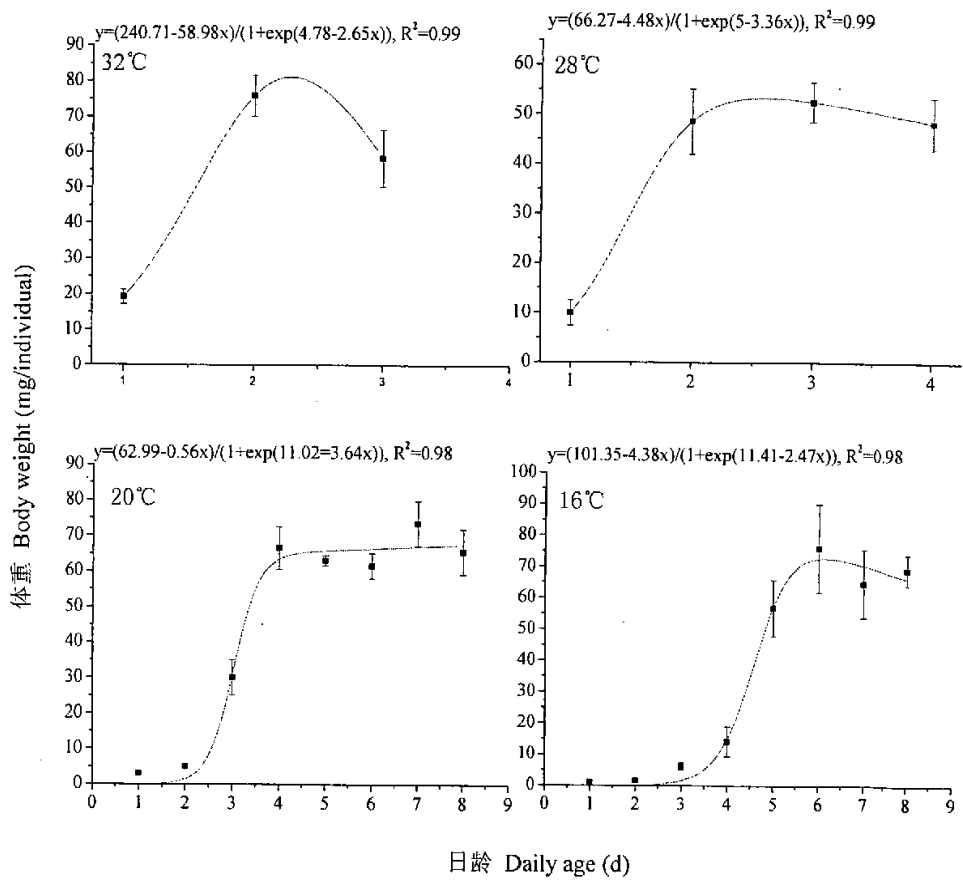


图 5.2 不同温度下棕尾别麻蝇幼虫期体重与日龄的关系

Fig 5.2 Relationship between larval weight of *Boettcherisca peregrina* under different temperatures

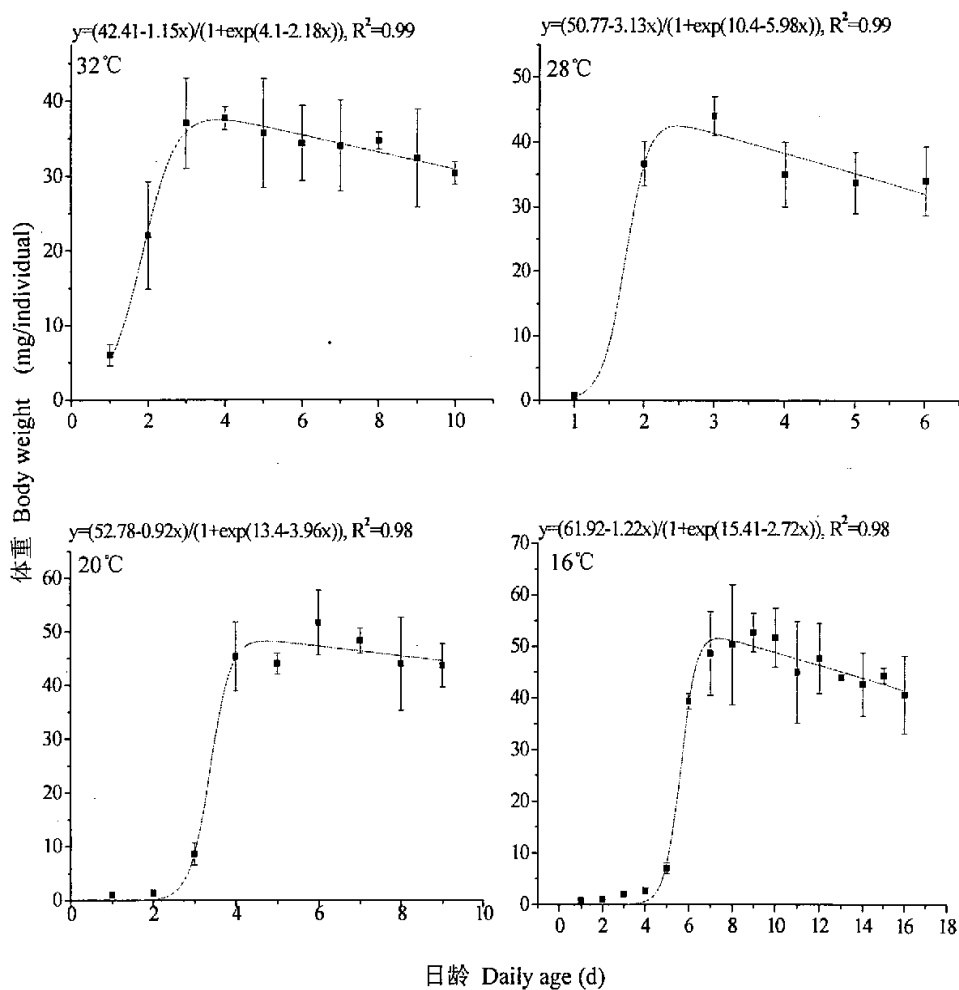


图 5.3 不同温度下丝光绿蝇幼虫期体重与日龄的关系

Fig 5.3 Relationship between larval weight of *Lucilia sericata* under different temperatures

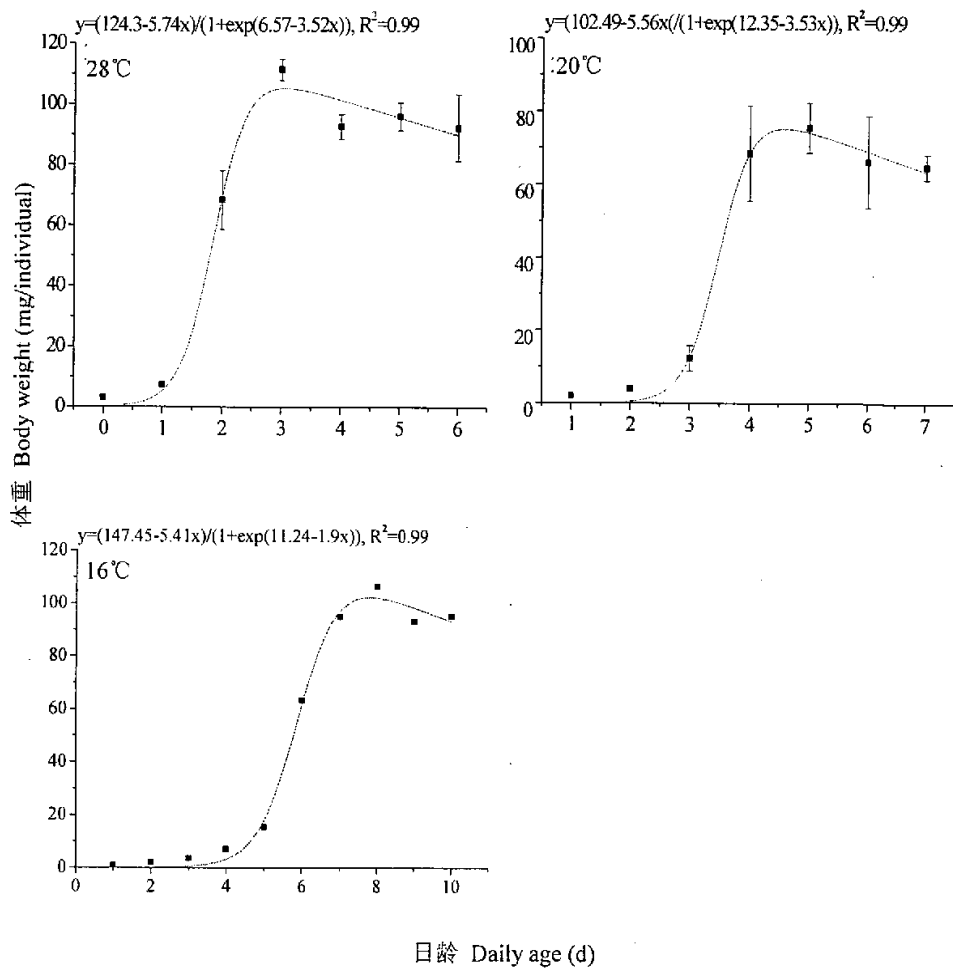


图 5.4 不同温度下巨尾阿丽蝇幼虫期体重与日龄的关系
Fig 5.4 Relationship between larval weight of *Aldrichina grahami* under different temperatures

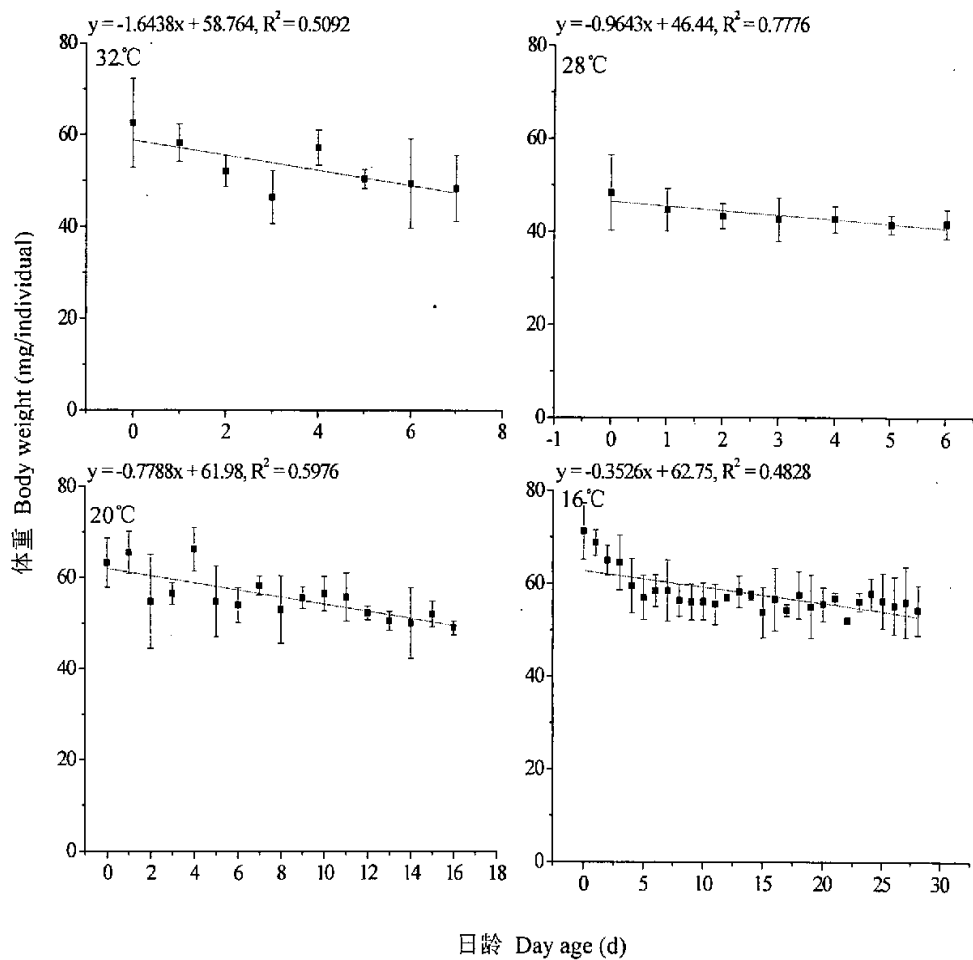


图 5.5 不同温度下下肥须亚麻蝇蛹期体重与日龄的关系

Fig 5.5 Relationship between pupal weight of *Parasarcophaga crassipalpis* under different temperature

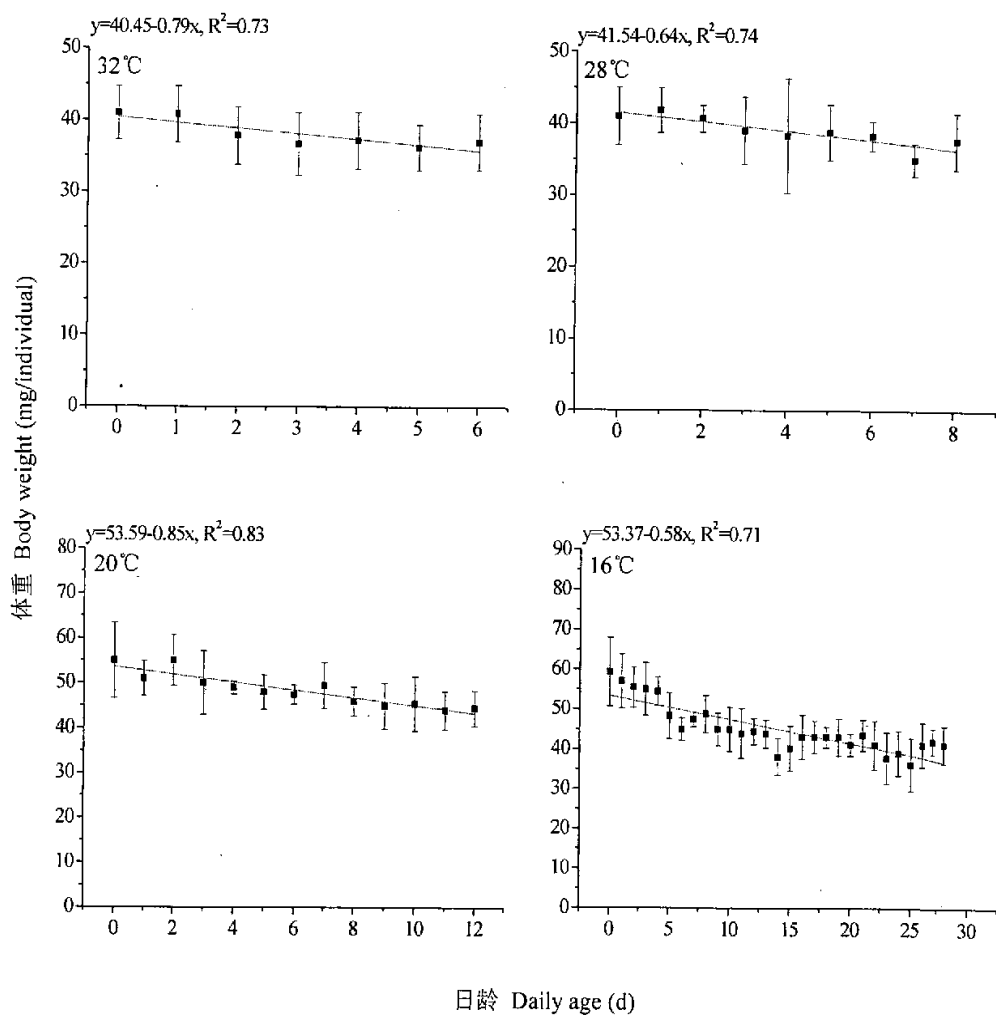


图 5.6 不同温度下棕尾别麻蝇蛹期体重与日龄的关系

Fig 5.6 Relationship between pupal weight of *Boettcherisca peregrina* under different temperatures

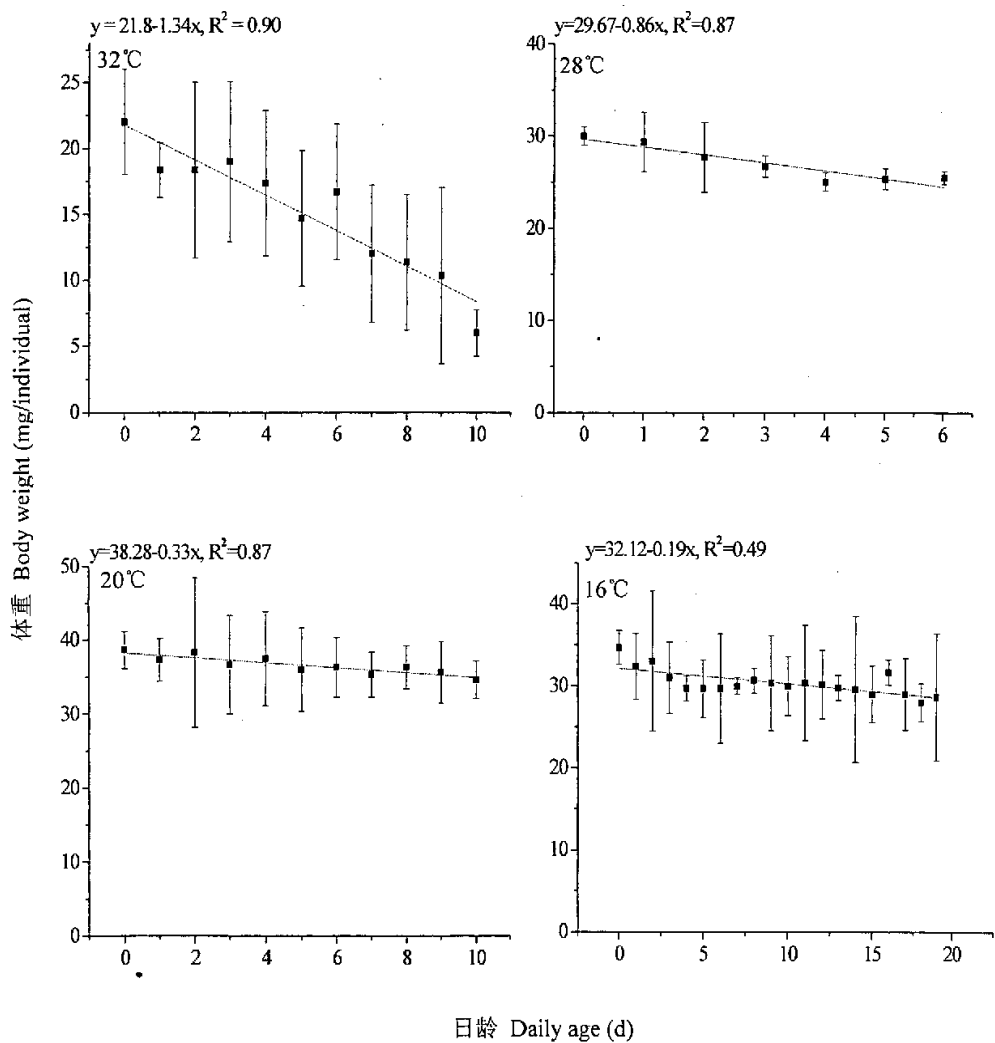


图 5.7 不同温度下丝光绿蝇蛹期体重与日龄的关系

Fig 5.7 Relationship between pupal weight of *Lucilia sericata* under different temperatures

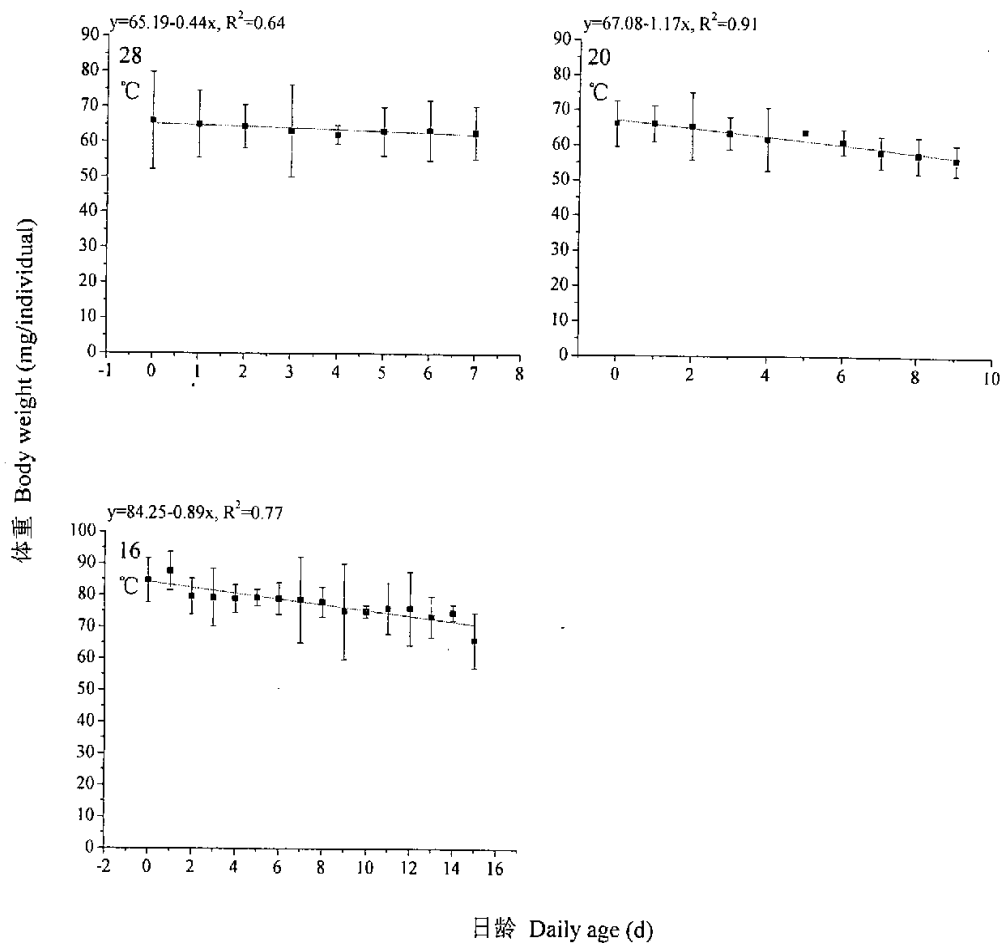


图 5.8 不同温度下巨尾阿丽蝇蛹期体重与日龄的关系
Fig 5.8 Relationship between pupal weight of *Aldrichina grahami* under different temperatures

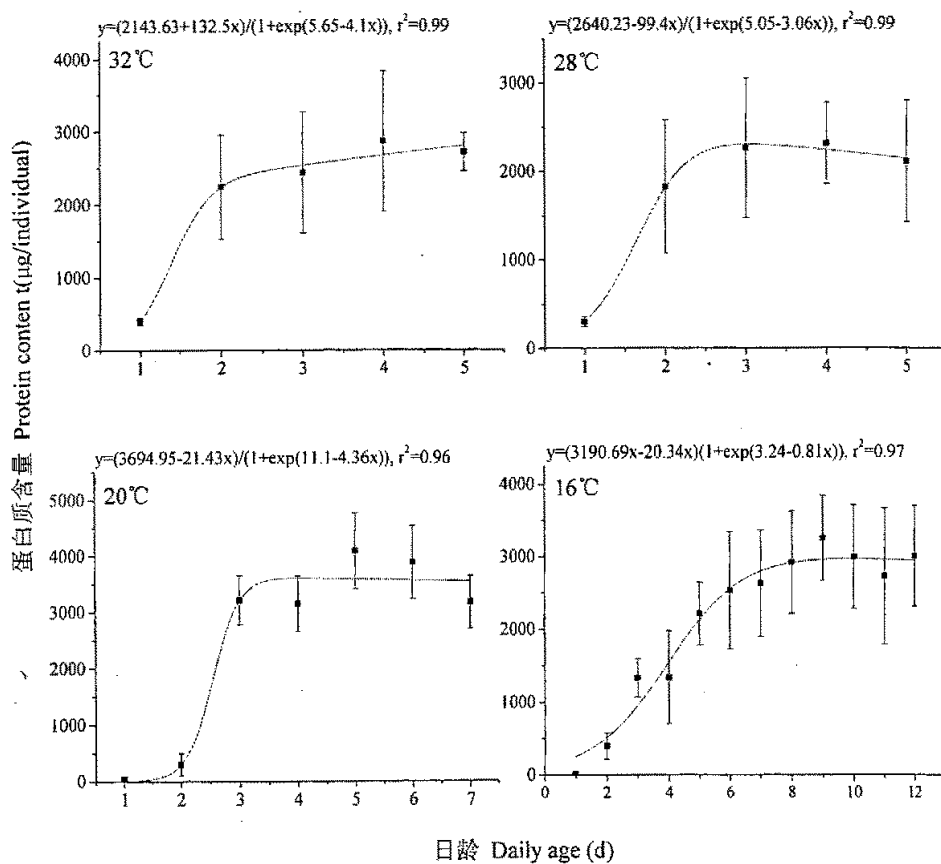


图 5.9 不同温度下肥须亚麻蝇幼虫期可溶性蛋白质与日龄的关系

Fig 5.9 Relationship between larval protein content of *Parasarcophaga crassipalpis* under different temperatures

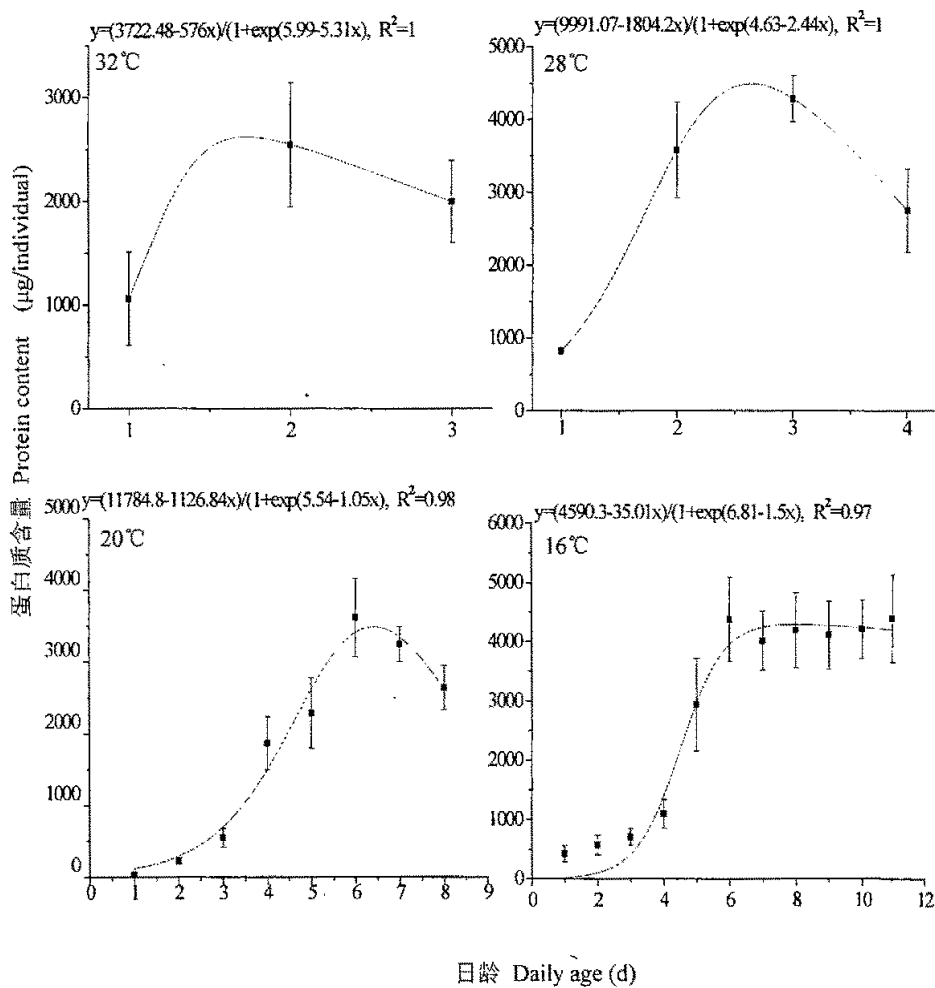


图 5.10 不同温度下棕尾别麻蝇幼虫期可溶性蛋白质与日龄的关系

Fig 5.10 Relationship between pupal protein content of *Boettcherisca peregrina* under different temperatures

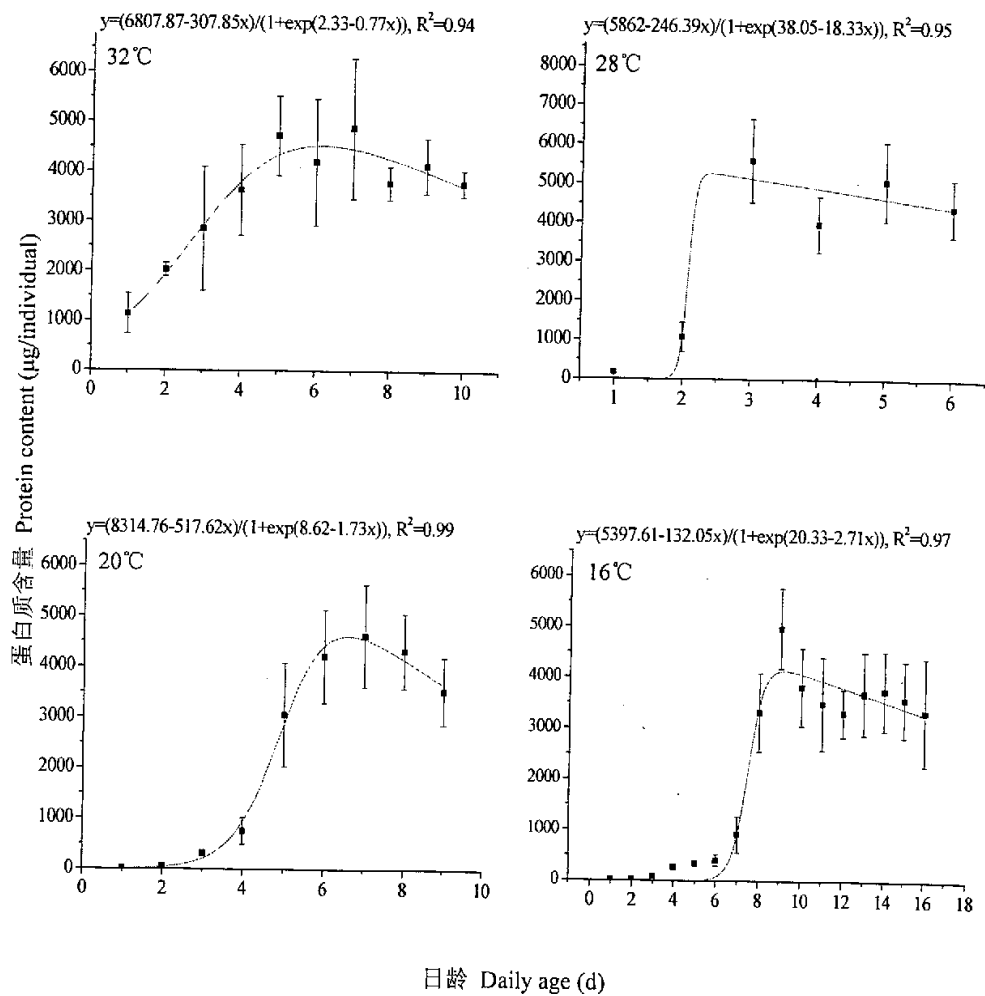


图 5.11 不同温度下丝光绿蝇幼虫期可溶性蛋白质与日龄的关系

Fig 5.11 Relationship between pupal protein content of *Lucilia sericata* under different temperatures

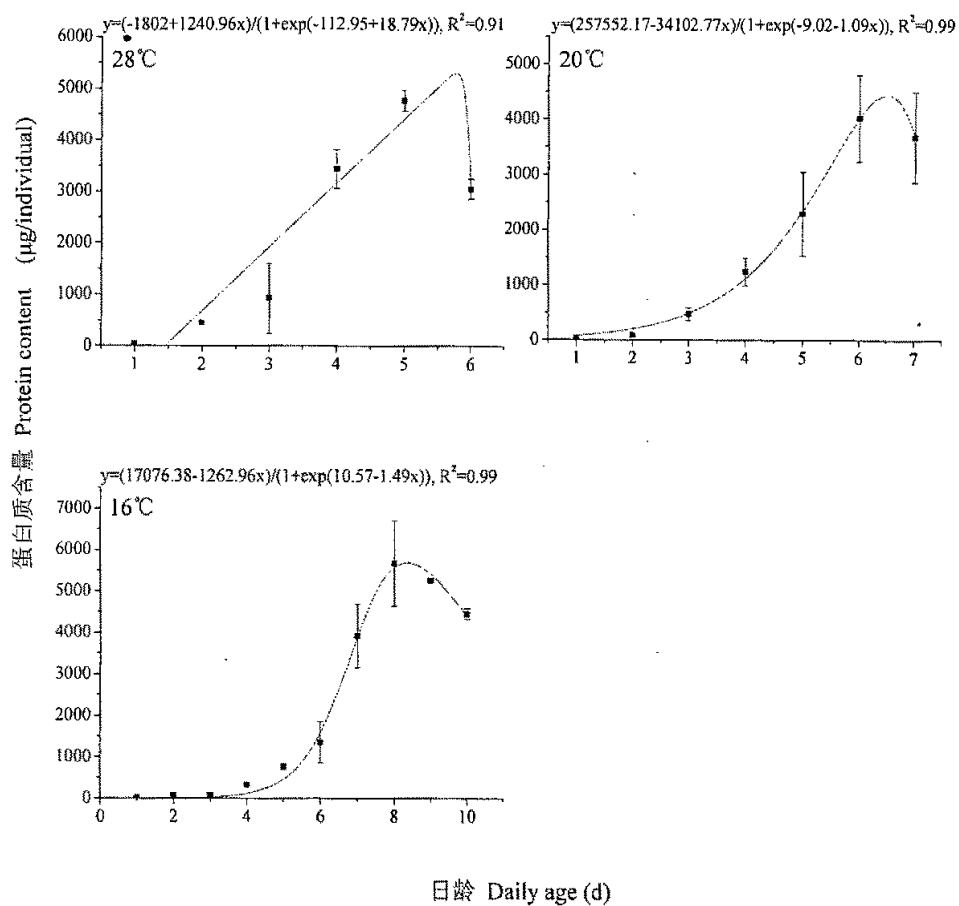


图 5.12 不同温度下巨尾阿丽蝇幼虫期可溶性蛋白质与日龄的关系

Fig 5.12 Relationship between pupal protein content of *Aldrichina grahami* under different temperatures

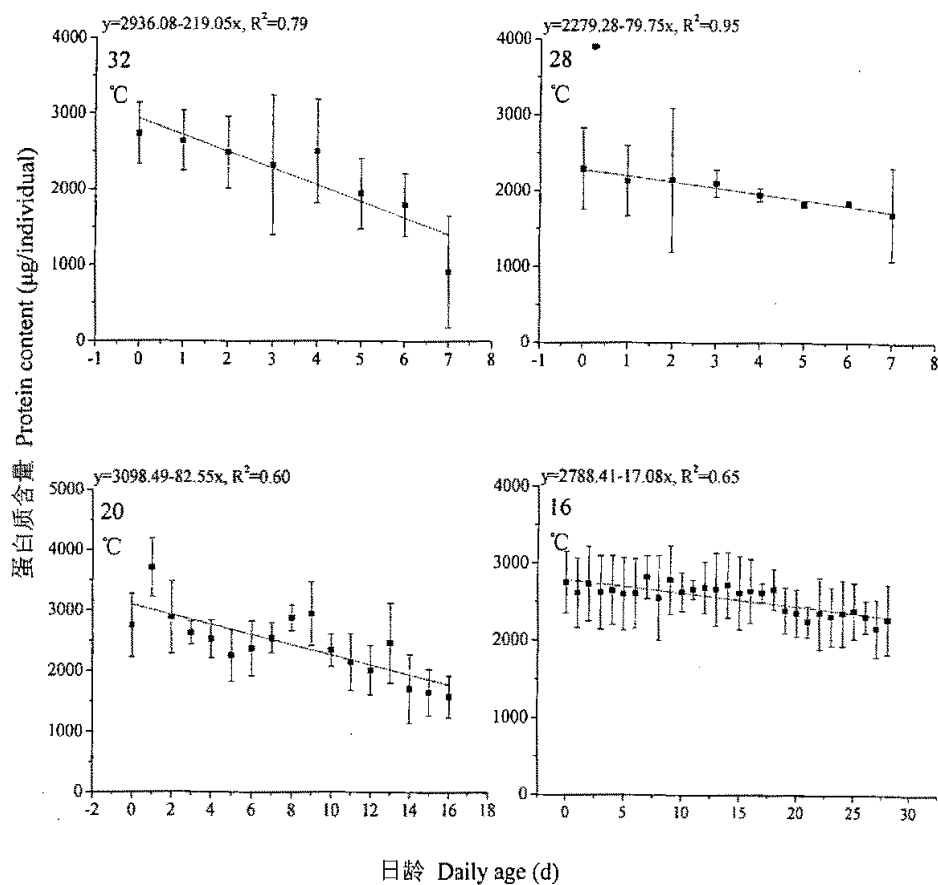


图 5.13 不同温度下肥须亚麻蝇蛹期可溶性蛋白质与日龄的关系

Fig 5.13 Relationship between pupal protein content of *Parasarcophaga crassipalpis* under different temperatures

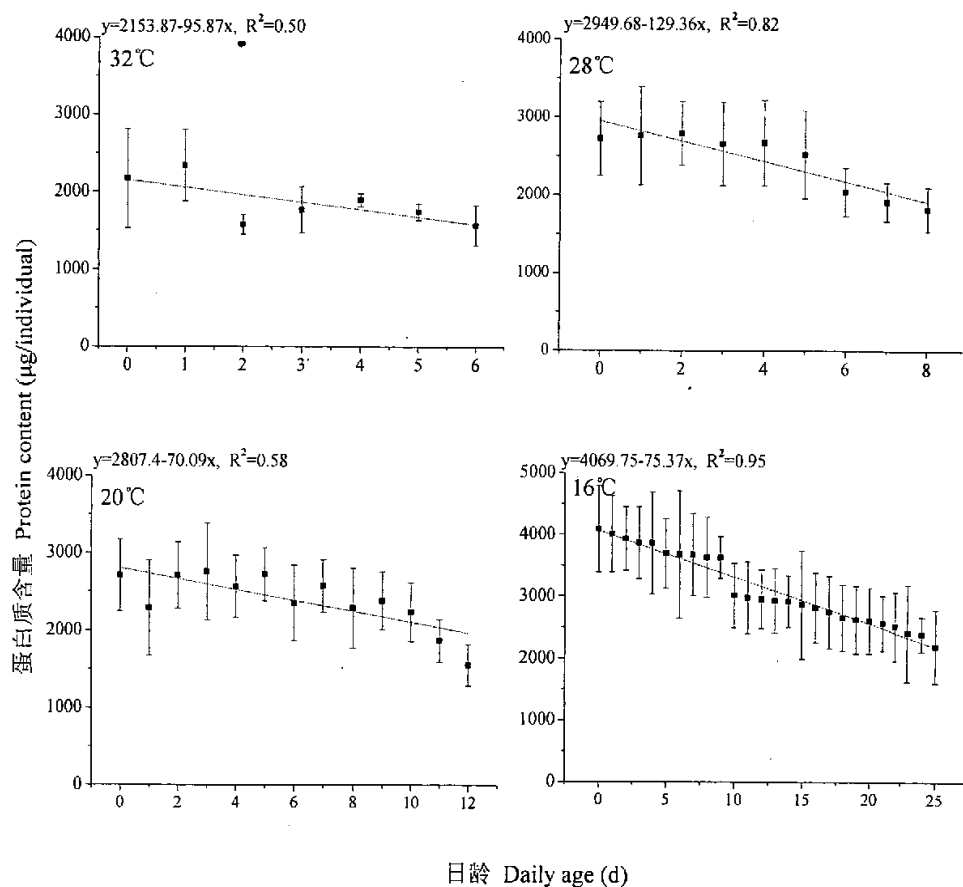


图 5.14 不同温度下棕尾别麻蝇蛹期可溶性蛋白质与日龄的关系

Fig 5.14 Relationship between pupal protein content of *Boettcherisca peregrina* under different temperatures

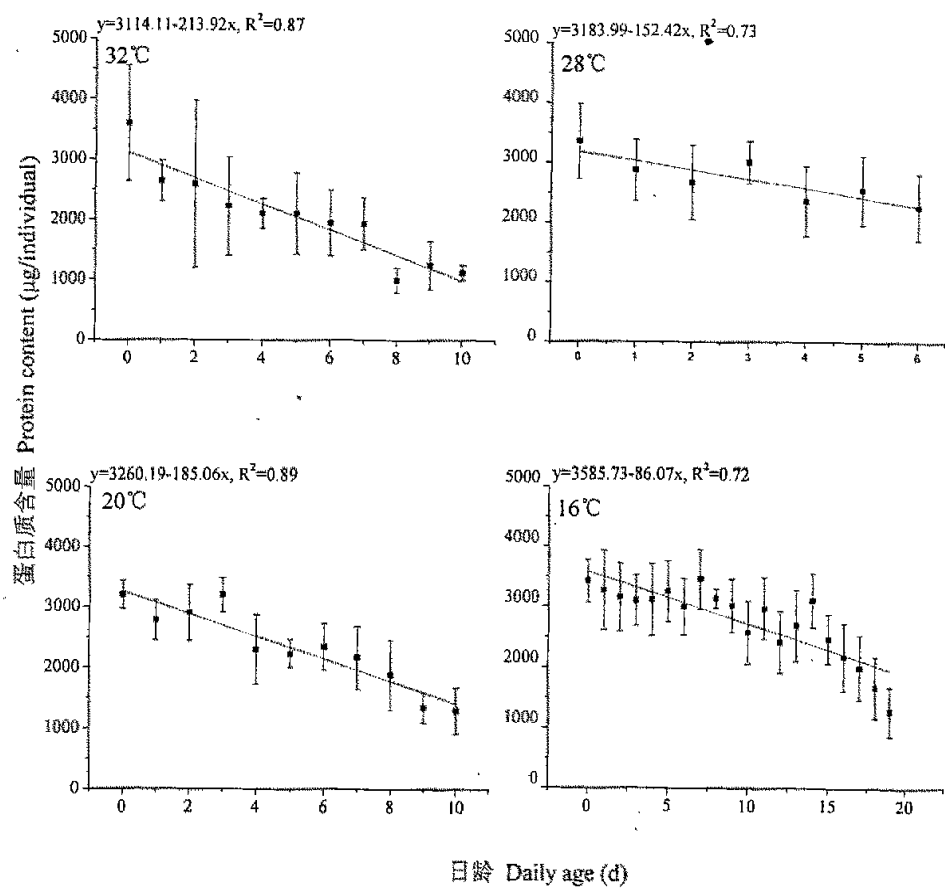


图 5.15 不同温度下丝光绿蝇蛹期可溶性蛋白质与日龄的关系

Fig 5.15 Relationship between larval protein content of *Lucilia sericata* under different temperatures

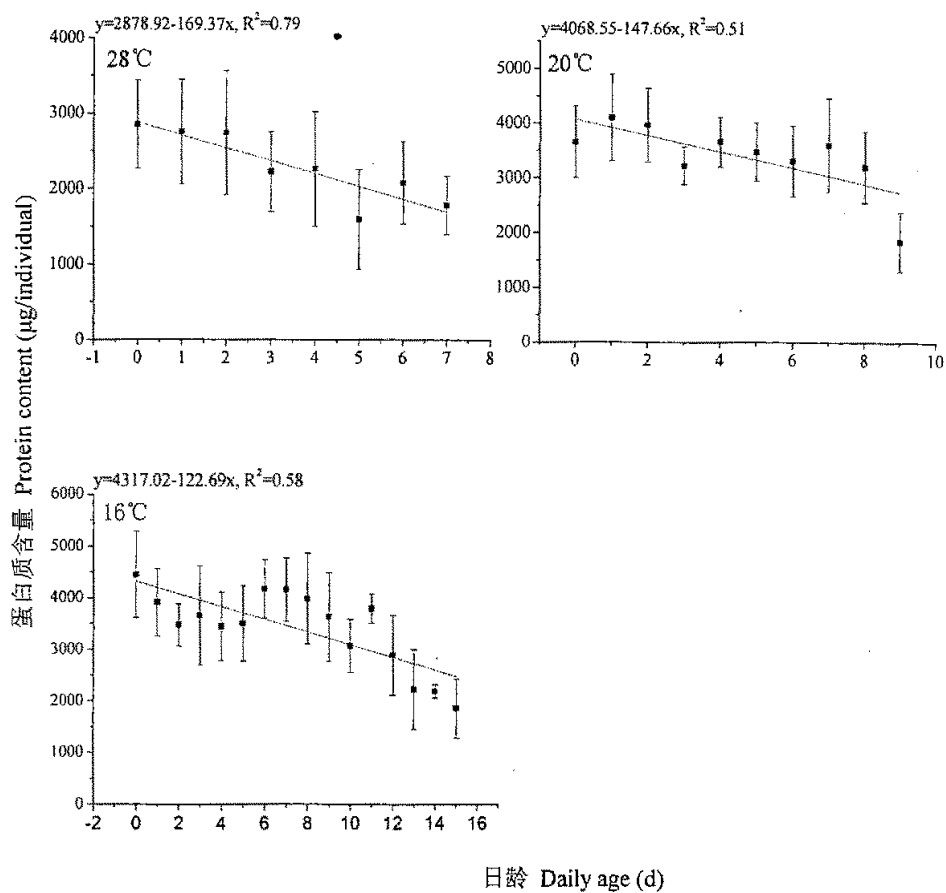


图 5.16 不同温度下巨尾阿丽蝇蛹期可溶性蛋白质与日龄的关系
Fig 5.16 Relationship between larval protein content of *Aldrichina grahami* under different temperatures

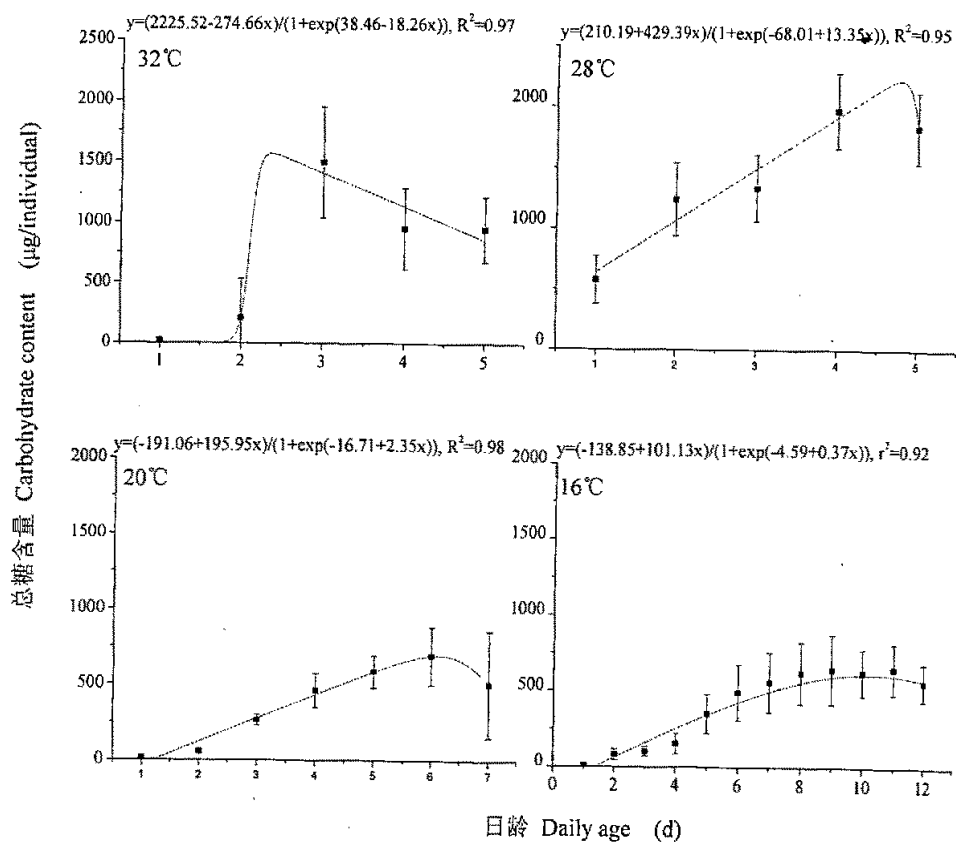


图 5.17 不同温度下肥须亚麻蝇幼虫可溶性总糖与日龄的关系
Fig 5.17 Relationship between larval carbohydrate content of *Parasarcophaga crassipalpis* under different temperatures

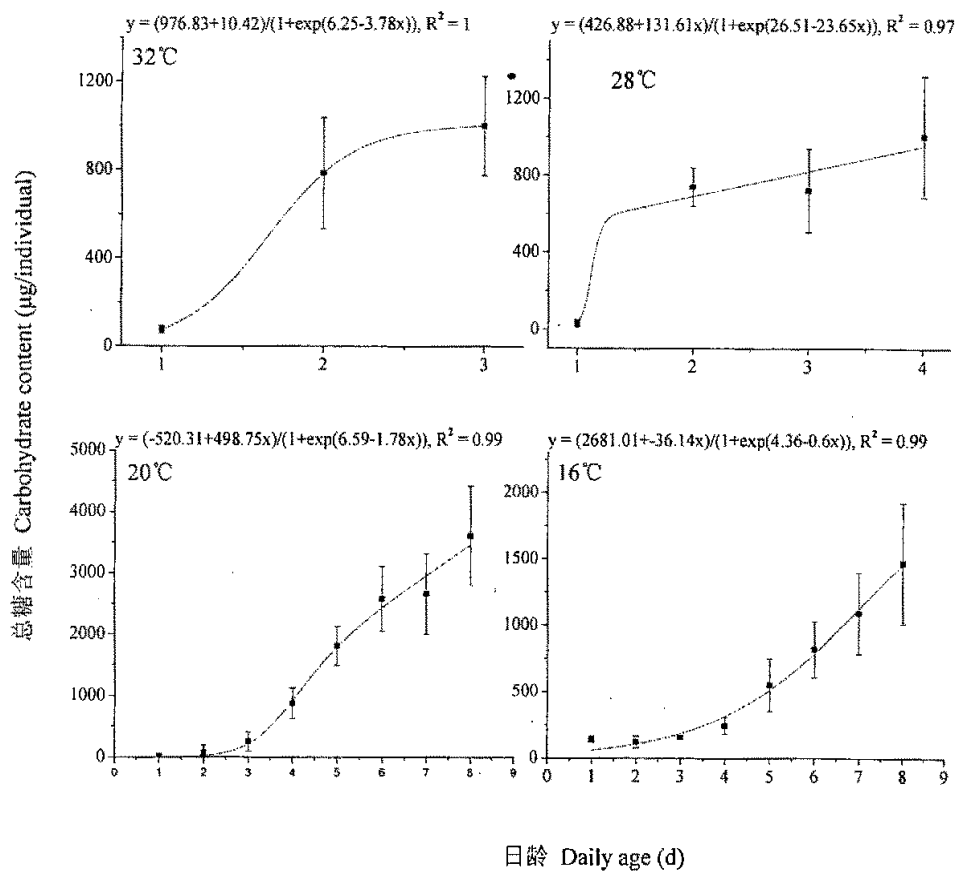


图 5.18 不同温度下棕尾别麻蝇幼虫期可溶性总糖与日龄的关系

Fig 5.18 Relationship between larval carbohydrate content of *Boettcherisca peregrina* under different temperatures

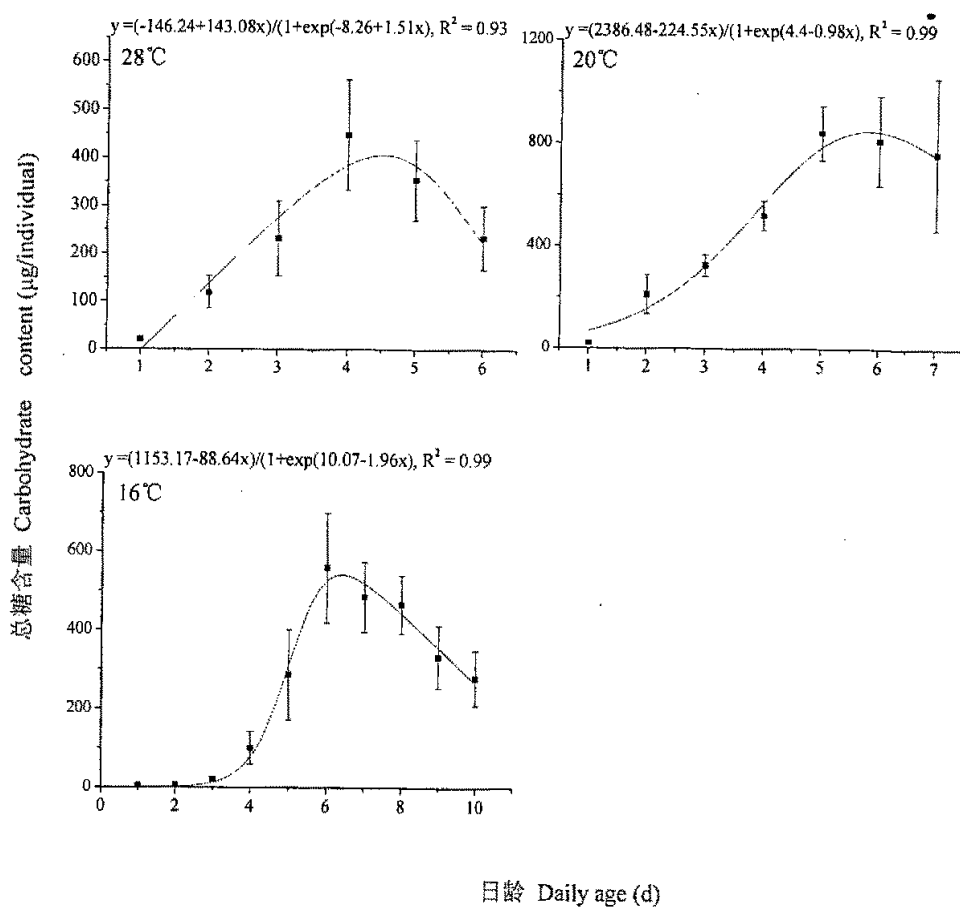


图 5.19 不同温度下巨尾阿丽蝇幼虫期可溶性总糖与日龄的关系
Fig 5.19 Relationship between larval carbohydrate content of *Aldrichina grahami* under different temperatures

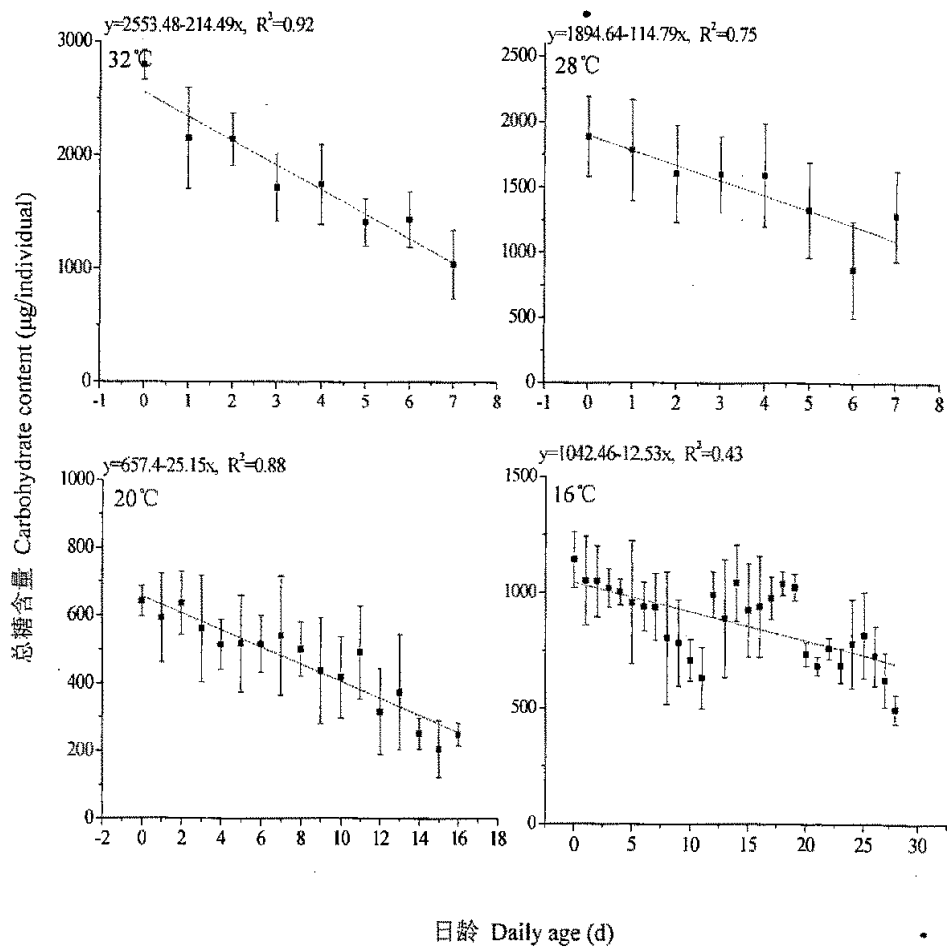


图 5.20 不同温度下肥须亚麻蝇蛹期可溶性总糖与日龄的关系

Fig 5.20 Relationship between pupal carbohydrate content of *Parasarcophaga crassipalpis* under different temperatures

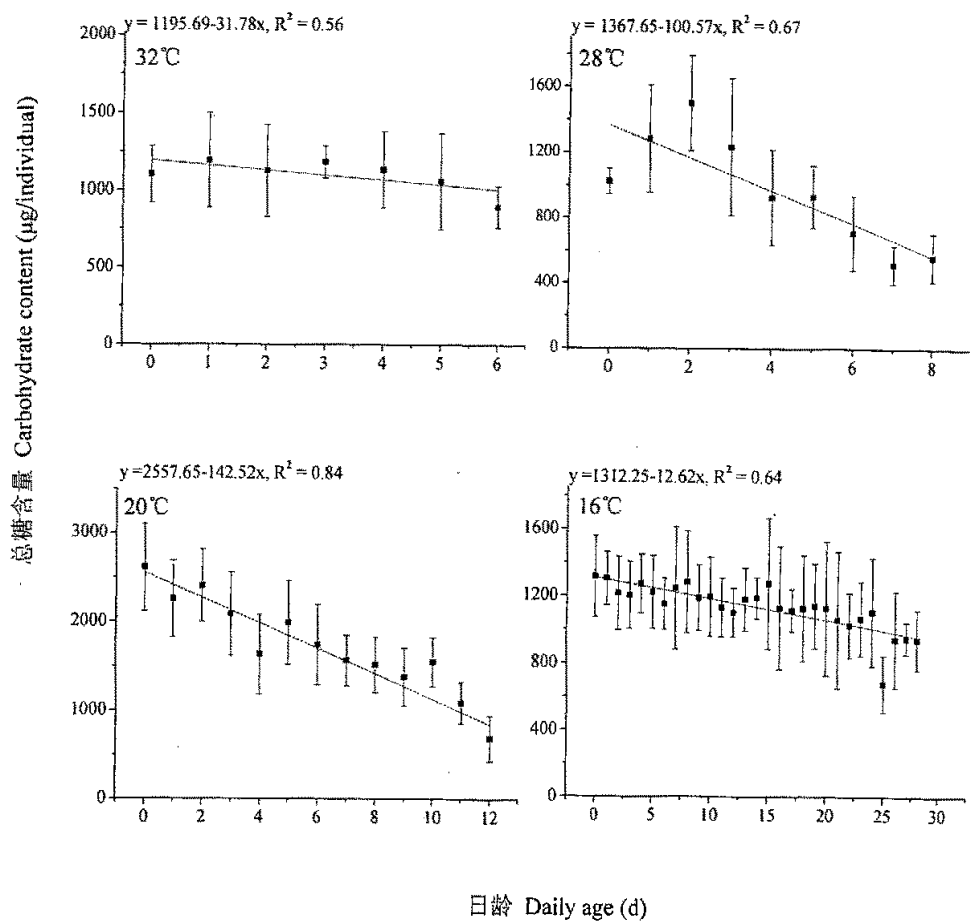


图 5.21 不同温度下棕尾别麻蛹期可溶性总糖与日龄的关系

Fig 5.21 Relationship between pupal carbohydrate content of *Boettcherisca peregrina* under different temperatures

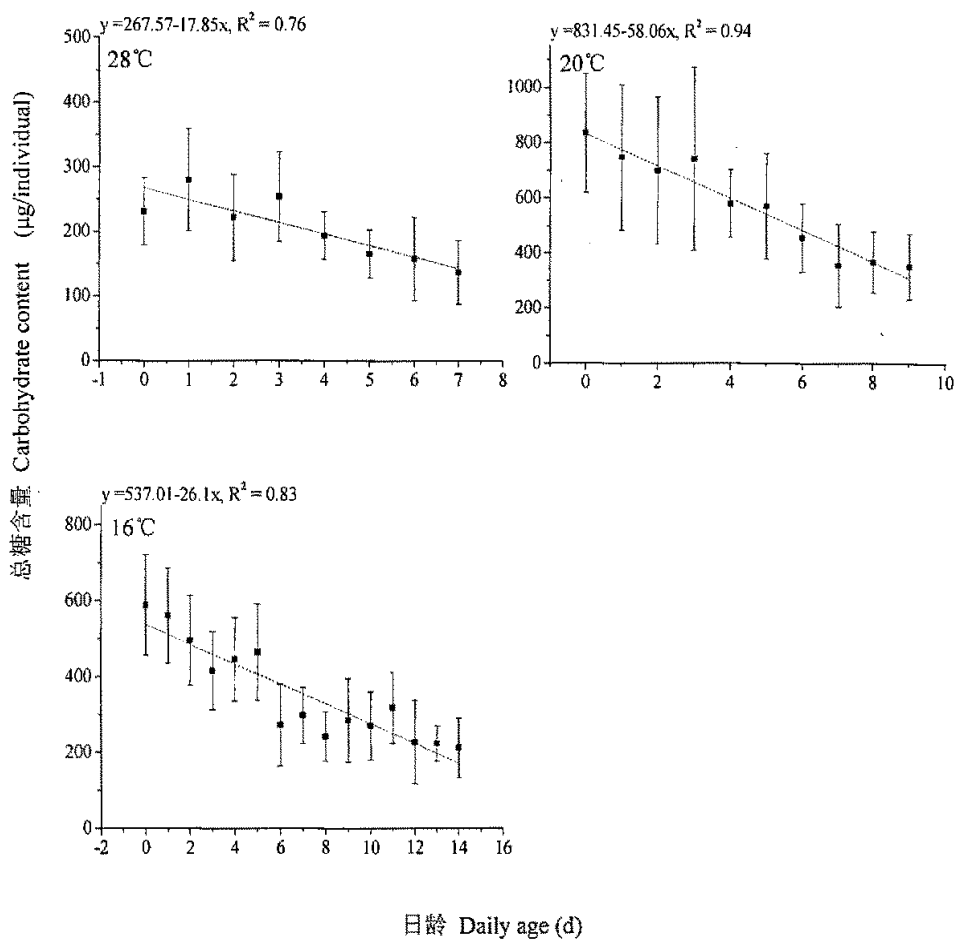


图 5.22 不同温度下巨尾阿丽蝇蛹期可溶性总糖与日龄的关系
 Fig 5.22 Relationship between pupal carbohydrate content of *Aldrichina grahami* under different temperatures

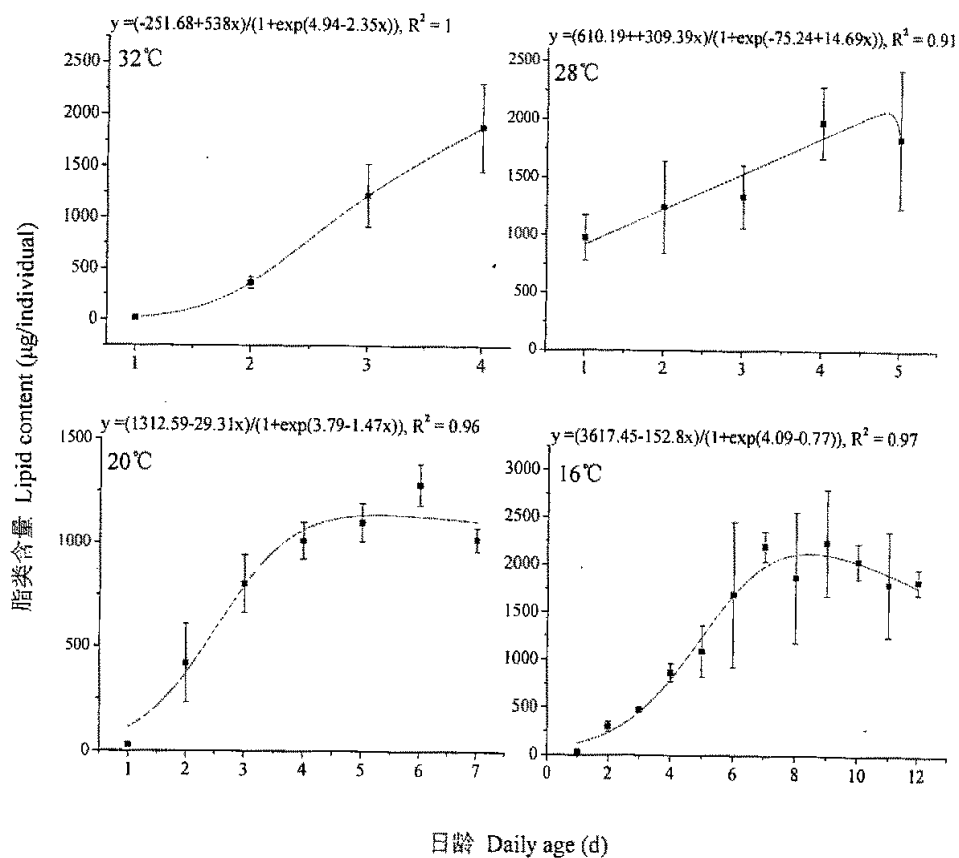


图 5.23 不同温度下肥须亚麻蝇脂类含量与日龄的关系

Fig 5.23 Relationship between larval lipid content of *Parasarcophaga crassipalpis* under different temperatures

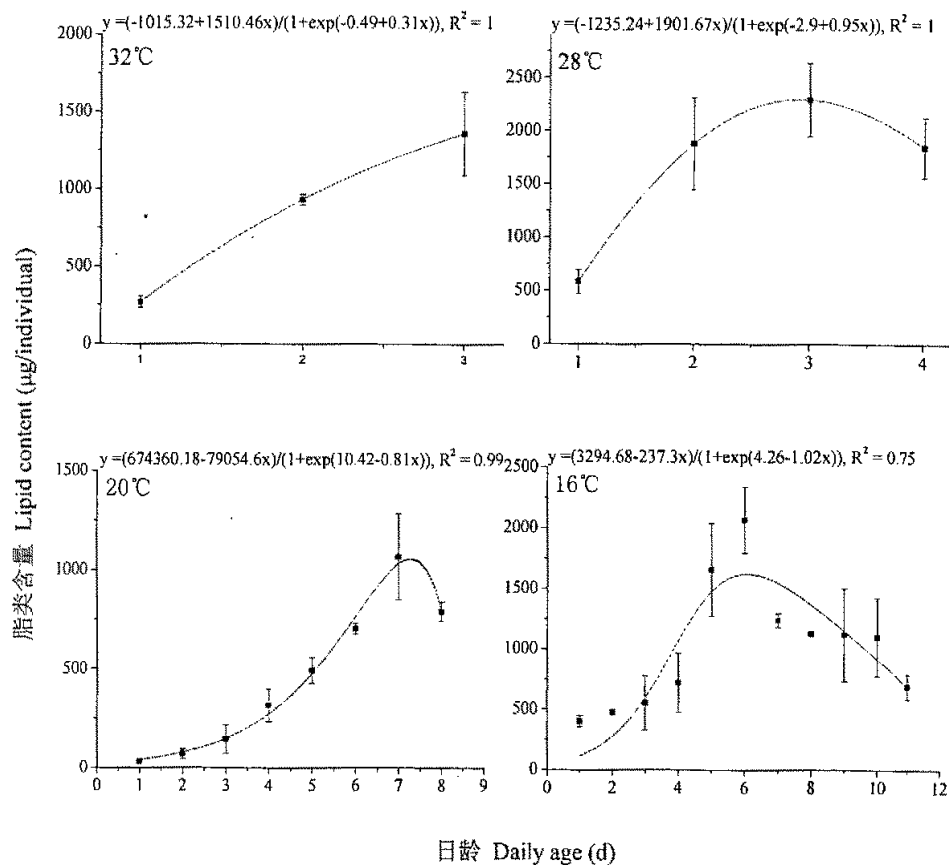


图 5.24 不同温度下棕尾别麻幼虫期脂类含量与日龄的关系

Fig 5.24 Relationship between larval lipid content of *Boettcherisca peregrina* under different temperatures

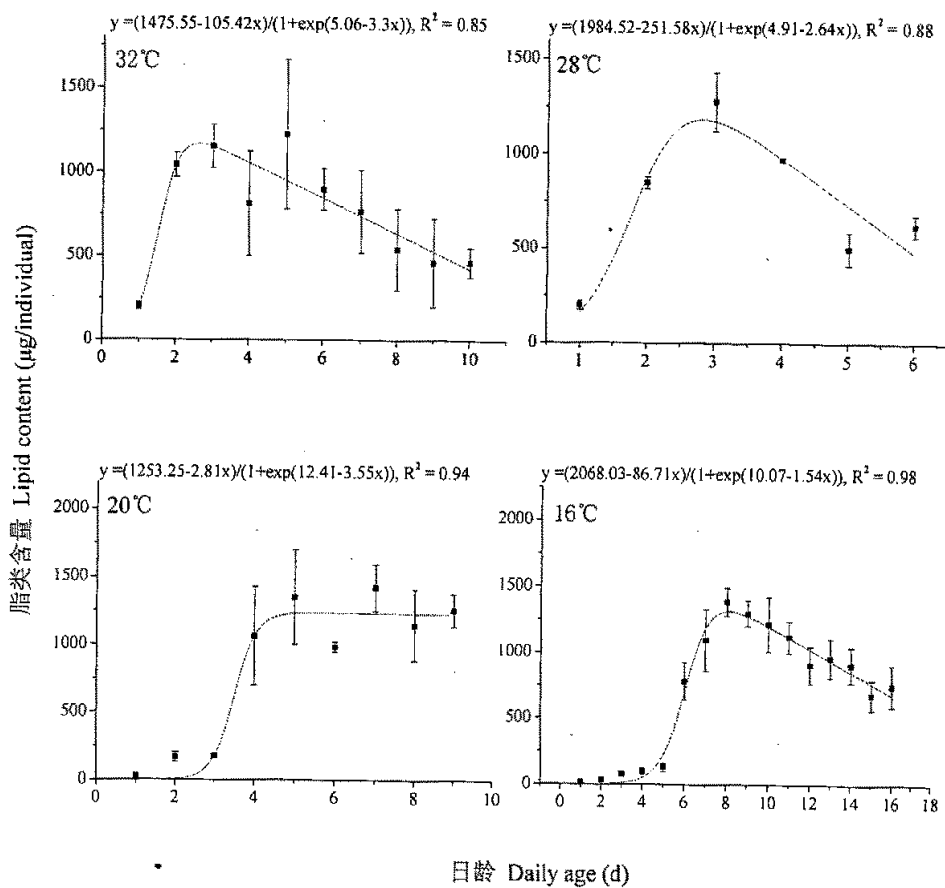


图 5.25 不同温度下丝光绿蝇幼虫期脂类含量与日龄的关系

Fig 5.25 Relationship between larval lipid content of *Lucilia sericata* under different temperatures

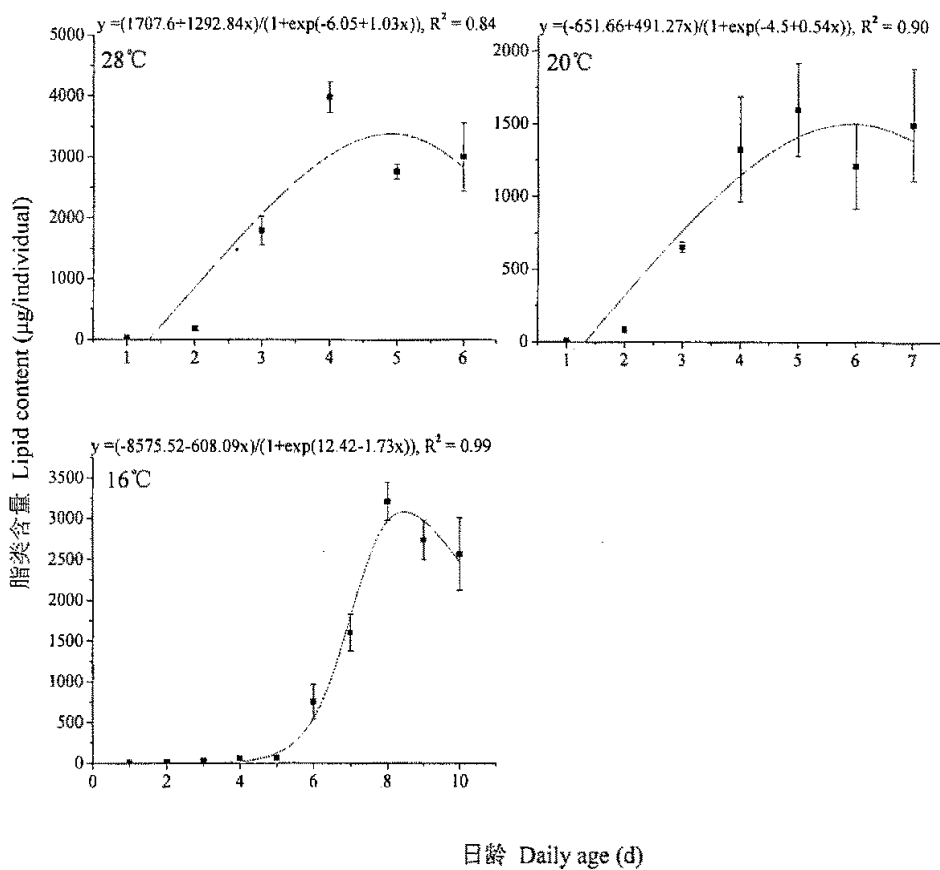


图 5.26 不同温度下巨尾阿丽蝇幼虫期脂类含量与日龄的关系
Fig 5.26 Relationship between larval lipid content of *Aldrichina grahami* under different temperatures

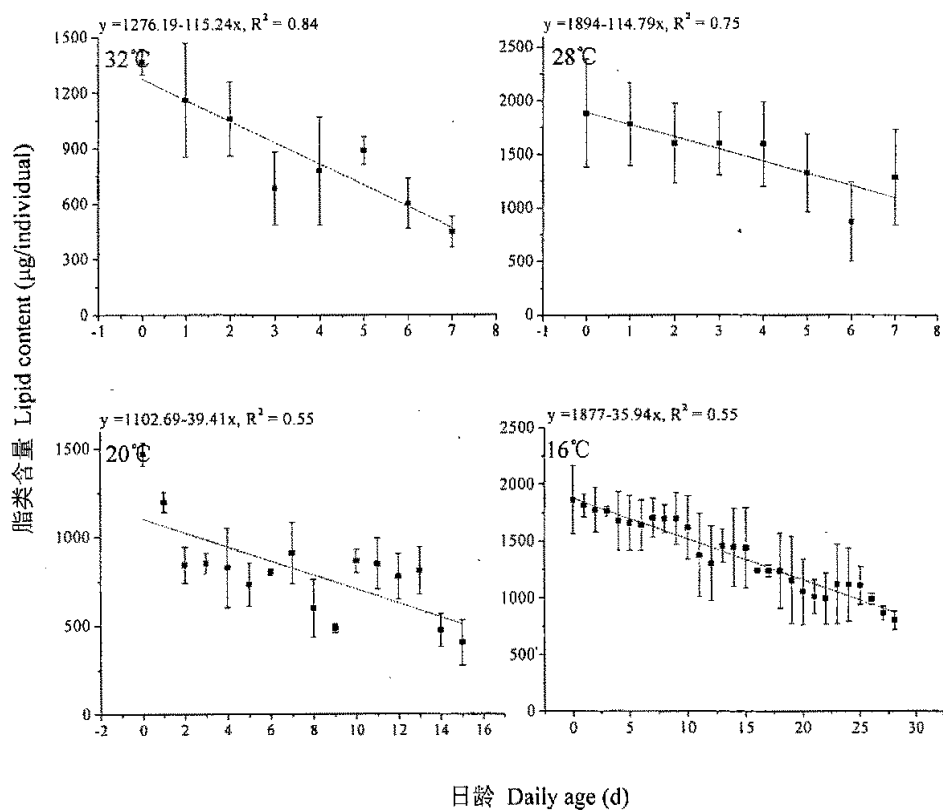


图 5.27 不同温度下肥须亚麻蝇蛹期脂类含量与日龄的关系

Fig 5.27 Relationship between Pupal lipid content of *Parasarcophaga crassipalpis* under different temperatures

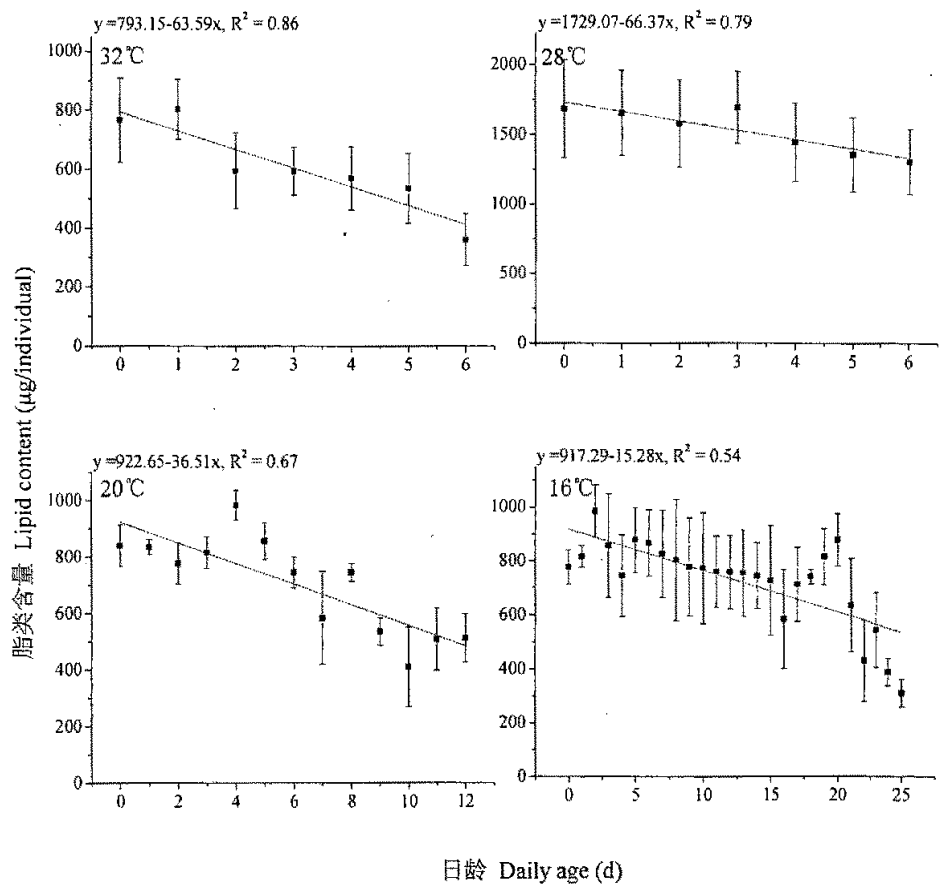


图 5.28 不同温度下棕尾别麻蛹期脂类含量与日龄的关系
 Fig 5.28 Relationship between pupal lipid content of *Boettcherisca peregrina* under different temperatures

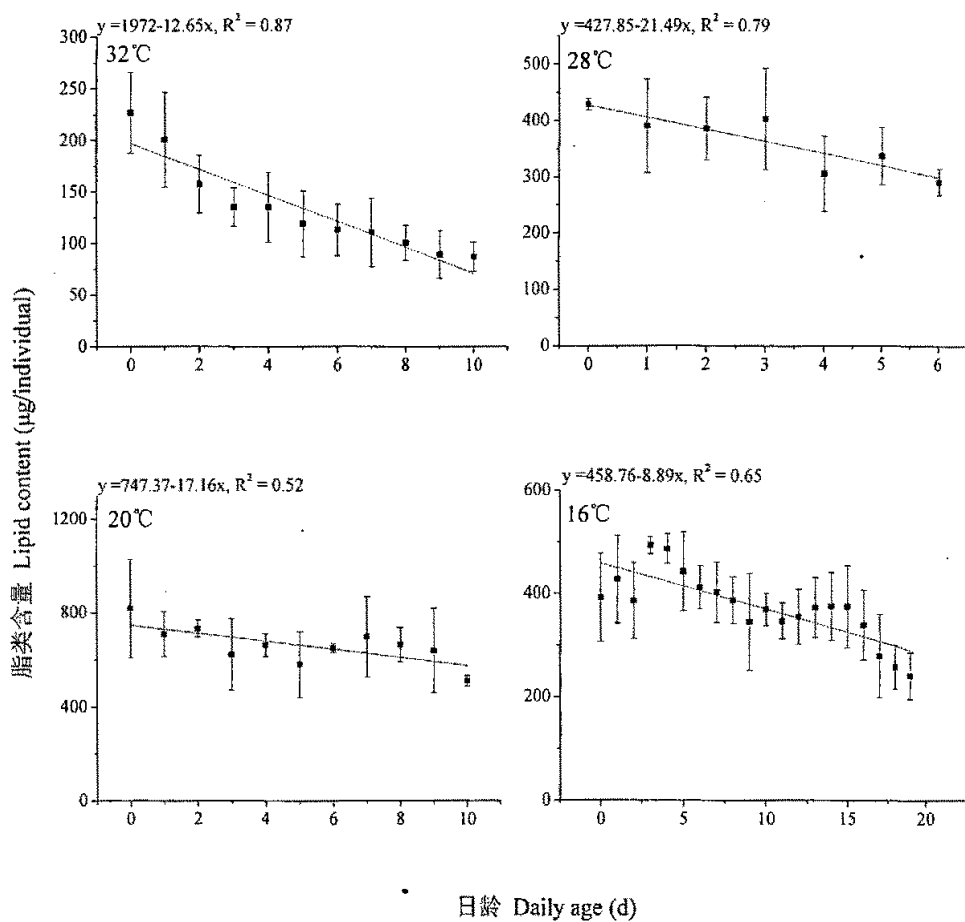


图 5.29 不同温度下丝光绿蝇蛹期脂类含量与日龄的关系

Fig 5.29 Relationship between Lipid content of pupae of *Lucilia sericata* under different temperatures

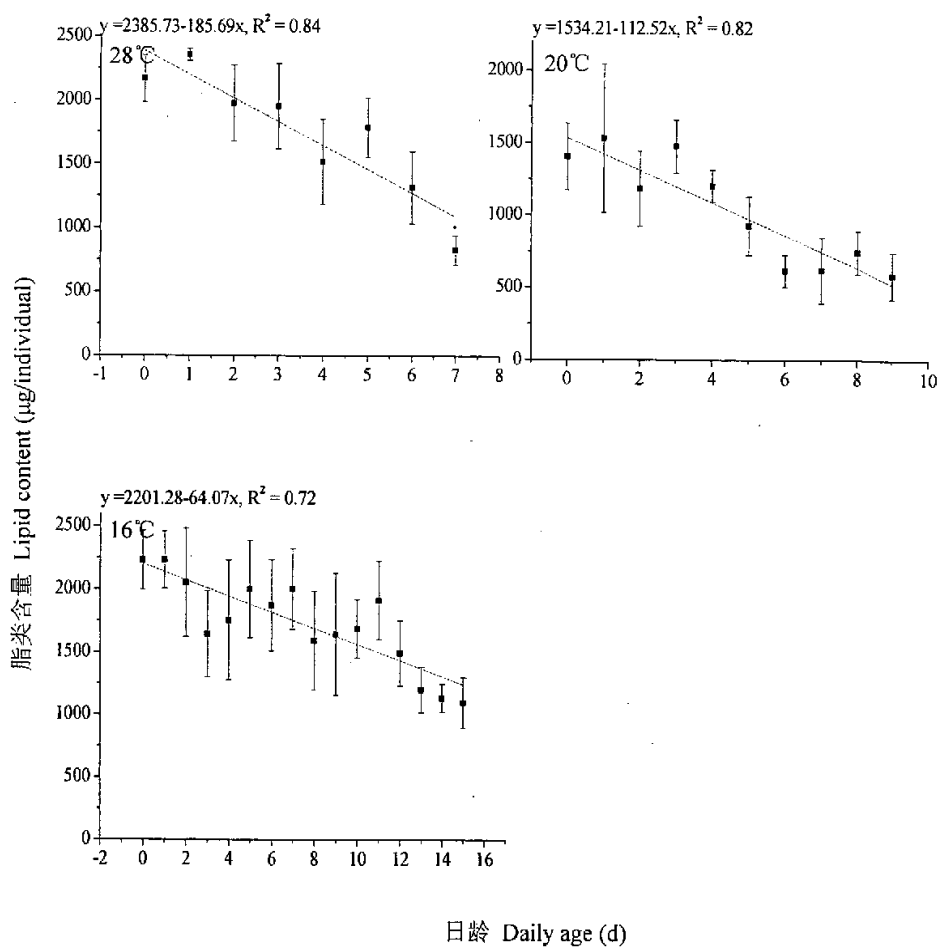


图 5.30 不同温度下巨尾阿丽蝇蛹期脂类含量与日龄的关系

Fig 5.30 Relationship between Lipid content of pupae of *Aldrichina grahami* under different temperatures

第六章 尸食性蝇类幼虫血淋巴可溶性蛋白组成的时间特征

昆虫的大部分组织细胞直接浸浴在血淋巴中,细胞与血淋巴间频繁的物质交换,就构成了血淋巴中复杂的物质体系和动态变化。而作为发育不可缺少的组成成分,各种不同的蛋白质在不同的发育阶段起着不同的生理功能,其中包括贮藏蛋白、卵黄原蛋白、载脂蛋白等。

昆虫血淋巴可溶性蛋白的组成与含量变化,这方面的研究文章可谓不计其数(Kim *et al.*, 1989; Koopmanschap *et al.*, 1992; Anscin *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1997; Shimoda *et al.*, 1997; Yoshiga *et al.*, 1998)。本文在朱光辉等(2003)基础上,对血淋巴可溶性蛋白的动态变化拓展开来,对肥须亚麻蝇和丝光绿蝇进行这方面的研究工作,并对其日龄特征进行了分析。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

肥须亚麻蝇,丝光绿蝇虫源同第四章。饲养温度为 24℃。

1.2 血淋巴的收集

将幼虫于产卵后不同日龄的幼虫或蛹 30 头从果酱瓶中取出,以蒸馏水漂洗数次,用干净滤纸吸干水分。用解剖针小心刺破幼虫或用的体壁,用毛细管吸取流出的血淋巴,滴入加有少量苯基硫脲晶体的冰浴离心管中,于 4℃ 以 10,000 rpm 离心 10 min,取出上清液,置-70℃ 冰箱保存备用。

1.3 SDS-PAGE 电泳

血淋巴稀释约 40 倍后,加等体积 SDS 电泳样品缓冲液,上样。采用 Tris-甘氨酸电极缓冲液系统,以垂直平板电泳槽进行电泳。分离胶、浓缩胶浓度各为 10% 和 4%,上样量为 10 μ l。浓缩胶和分离胶分别以 5 mA 和 15 mA 稳流电泳,电泳槽和电泳仪分别为 Bio-Rad 公司的 Mini-Protein III 和 Model 3000 Xi。电泳完毕后,凝胶以考马斯亮蓝染色 2 h 后脱色。脱色后,用 Bio-Rad 公司的 GS-800 光密度扫描仪扫描,并用 Quantity-one 软件分析各蛋白条带含量的变化。蛋白质分子量根据标准蛋白的分子量由软件直接计算得出。标准蛋白购自上海生物工程有限公司和 Bio-Rad 公司。

2 结果

2.1 肥须亚麻蝇

电泳图如图 6.1 和各组分光密度值如表 6.1 所示。

24℃ 下,肥须亚麻蝇产仔后 3~8 日龄幼虫和 0~9 日龄蛹的血淋巴中共出现 6 条清晰可

见的蛋白带，其分子量介于 31~230KDa 之间，其余蛋白条带因含量过少不够清晰，故未统计。各蛋白带的含量在生长发育过程中呈现一定规律的变化。

幼虫期血淋巴中，除了 L3（幼虫 3 日龄，下同）基本上只有三条蛋白带，呈现比较独特的蛋白谱带模式，而其他日龄的蛋白带都比较丰富，但多数含量较低。其中随着日龄的增加，a 带（230 KDa）含量逐渐增加，但在幼虫期最后一天突然下降；其余大部分蛋白带包括含量最为丰富的 b 带在 L5 时达到顶峰，但随着日龄增加逐渐减少；其他各条带在幼虫期血淋巴中含量较低，变化也不明显。

蛹期 a 带在 P0（初化蛹）时较少，P1 时最多，随着蛹日龄的增加其含量又逐渐的减少；变化比较明显的有 b、e 带和 c 带，三者在初化蛹的 P1 时降到一个低谷，然后在 P2 时又有明显的回升，之后逐渐下降，待羽化前两天 P8 和 P9 时下降较显著；其他各条带的含量则变化不明显。

2.2 丝光绿蝇

电泳图如图 6.2 和组分分光密度值如表 6.2 所示。

24℃下，丝光丽蝇产卵后 2~8 日龄幼虫和 0~8 日龄蛹的血淋巴中共出现 16 条清晰可见的蛋白带，其分子量介于 18~230KDa 之间。各蛋白带的含量在生长发育过程中呈现一定规律的变化。

幼虫期血淋巴中，除了 L2 基本上只有三条蛋白带，呈现比较独特的蛋白谱带模式，而其他日龄的蛋白带都比较丰富。其中随着日龄的增加，A 带（230 KDa）和 P 带（18 KDa）的含量逐渐增加，大部分蛋白带包括含量最为丰富的 G 带在 L4 时达到顶峰，F 带（83 KDa）在 L3 时开始出现，然后逐渐增加，以 L7 和 L8 时为最丰富；G 带（81 KDa）L2 时就开始出现，但是在整个幼虫期变化不是很明显；P 带随着日龄逐渐增多，L6 时基本稳定；其他各条带在幼虫期血淋巴中含量较低，变化也不明显。

蛹期 A 带在 P0 时较少，P1 时最多，随着蛹日龄的增加其含量又逐渐的减少；变化比较明显的是 F 带和 G 带，两者在初化蛹的 P0 时降到一个低谷，然后在 P2 时又有明显的回升，之后逐渐稳定，待羽化前两天 P6 和 P7 时又有一个显著的下降；其他各条带的含量则变化不明显。

3 讨论

本研究表明，肥须亚麻蝇和丝光绿蝇血淋巴可溶性蛋白的组成在幼虫期和蛹期有着显著变化，这与其他一些昆虫血淋巴蛋白组成的研究结果基本一致（Kim *et al.*, 1989;

Koopmanschap *et al.*, 1992; Anscin *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1997; Shimoda *et al.*, 1997; Yoshiga *et al.*, 1998)。同时也表明,血淋巴可溶性蛋白的组成在肥须亚麻蝇与丝光绿蝇的幼虫和蛹的日龄推断中具有一定的应用潜力,并可进一步应用于死后间隔时间的推断。

在幼虫和蛹期血淋巴中 b 和 G 带是所有蛋白带中含量最高的,其含量在三龄幼虫中显著增加而于蛹期逐渐降低,这与其他昆虫血淋巴中贮藏蛋白的发生规律基本一致(Kim *et al.*, 1989; Koopmanschap *et al.*, 1992; Anscin *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1997; Shimoda *et al.*, 1997; Yoshiga *et al.*, 1998)。可以确定 b 和 G 带是贮藏蛋白,而其他蛋白带的性质有待于进一步研究。

从各日龄幼虫和蛹期血淋巴组成的差异看,24℃下,幼虫早期具有独特的蛋白质电泳图谱,可以与此后各日龄幼虫相区别开来。在三龄幼虫中, a、c、A、F 和 P 带的含量差异较为显著;在各日龄蛹中, a、c、A、F 和 G 带的含量有一定差异。这些蛋白带在幼虫或者蛹期各日龄间含量的差异具有应用于日龄推断的价值,但是由于电泳技术在蛋白质定量方面固有的补足,如果应用免疫学方法对幼虫期和蛹期血淋巴中各蛋白质含量的时间动态进行分析,选择含量随日龄呈规律性变化的蛋白质作为日龄指标,建立日龄与各蛋白质含量的多元回归模型,同时考虑温度等因素的影响,则血淋巴可溶性蛋白的组成可有效用于尸食性蝇类幼虫和蛹的日龄推断,并进一步用于死后间隔时间的推断。24℃下,初孵化幼虫虫体太小,血淋巴取样困难,本文未对其加以研究,但根据其个体很小即可将其与其他各日龄幼虫分开,故对本方法的实际应用并无影响。

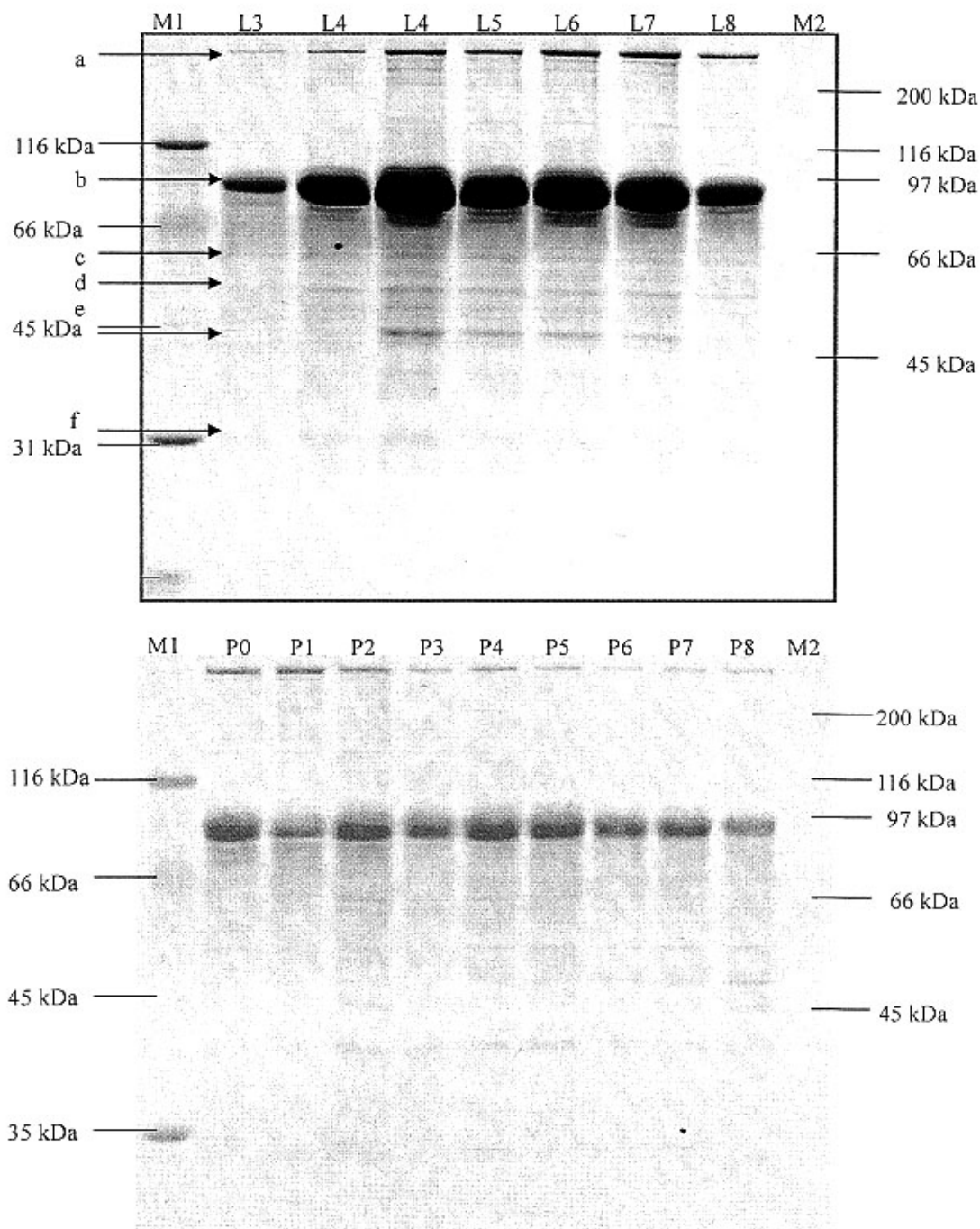


图 6.1 肥须亚麻蝇幼虫和蛹期血淋巴可溶性蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (10%) 图谱。上图为幼虫期，下图为蛹期；M1, M2: 分子量标准；L3~L8: 产卵后 3~8 日龄幼虫；P0~P8: 0~8 日龄蛹

Fig 6.1 SDS-polyacrylamide gel (10%) electrophoresis profile of hemolymph soluble proteins in larvae and pupae of *Parasarcophaga crassipalpis*

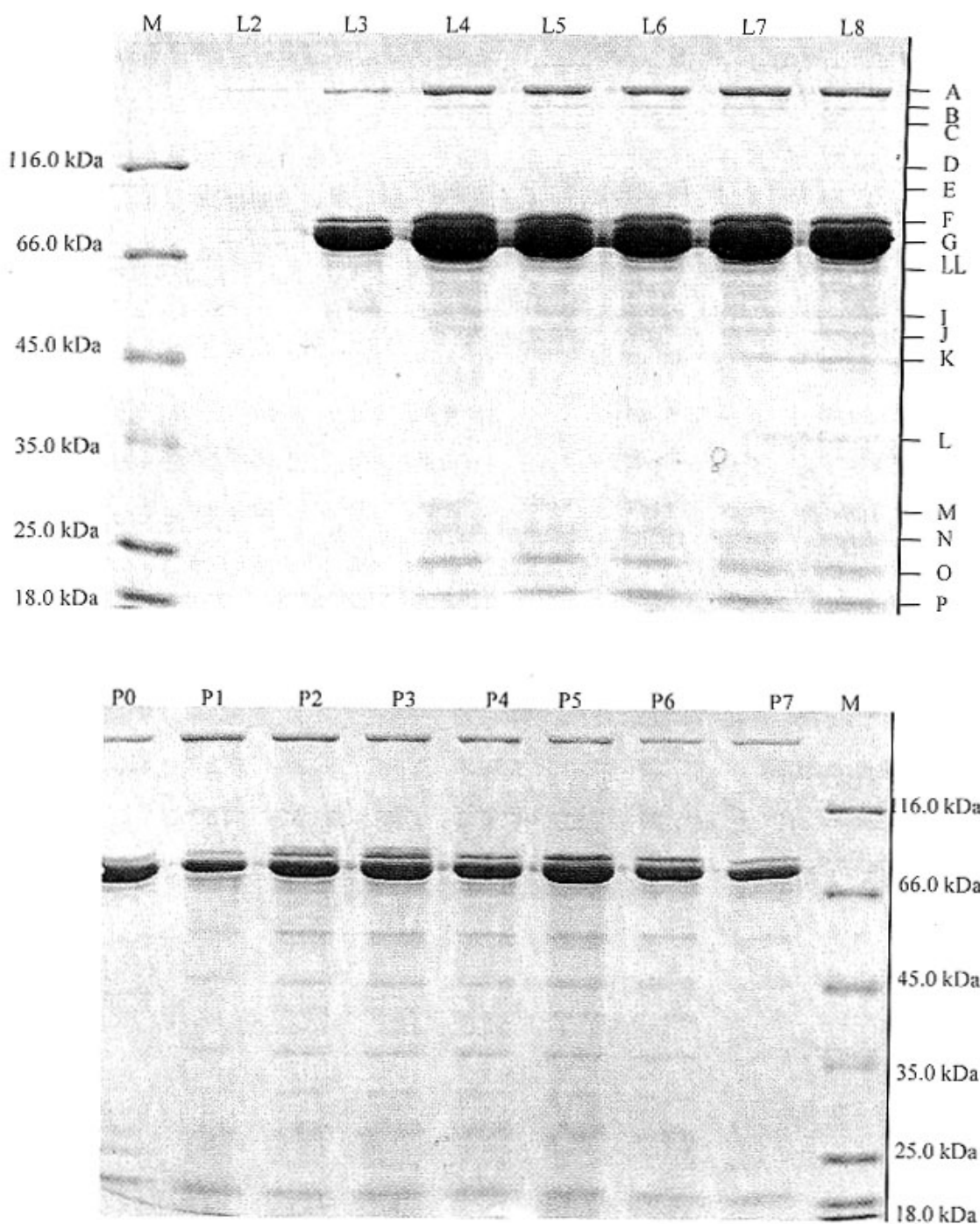


图 6.2 丝光绿蝇 *Lucilia sericata* 幼虫和蛹期血淋巴可溶性蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (10%) 图谱。上图为幼虫期，下图为蛹期；M：分子量标准；L3~L8：产卵后 3~8 日龄幼虫；P0~P7：0~7 日龄蛹

Fig 6.2 SDS-polyacrylamide gel (10%) electrophoresis profile of hemolymph soluble proteins in larvae and pupae of *Lucilia sericata*

表 6.1 肥须亚麻蝇幼虫期和蛹期可溶性蛋白组成及其含量检测的时间动态
 Table 6.1 Development profile of hemolymph soluble proteins during the larval and pupal stages of *Parasarcophaga crassipalpis*

条带 标签	分子 量 (kDa)	幼虫日龄										蛹日龄					
		L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
a	230	0.034	0.084	0.194	0.201	0.215	0.266	0.118	0.199	0.226	0.169	0.072	0.092	0.064	0.047	0.041	0.042
b	81	0.626	2.186	3.709	2.874	2.845	2.650	1.327	1.23	0.717	1.244	0.887	1.212	1.101	0.843	0.531	0.531
c	76	0.1	0.15	0.23	0.19	0.18	0.17	0.14	0.132	0.145	0.137	0.106	0.096	0.106	0.097	0.101	0.069
d	61	-	0.047	0.14	0.068	0.063	0.053	0.039	0.052	0.048	0.051	-	0.53	0.053	0.048	0.054	0.048
e	55	-	0.063	0.088	0.061	0.058	0.064	0.045	0.054	0.064	0.091	0.069	0.076	0.076	0.066	0.069	0.052
f	31	-	0.045	0.047	0.041	0.039	0.037	0.032	0.039	0.049	0.057	0.045	0.055	0.054	0.044	0.046	0.041

注：“-”，未检测到。

表 2 丝光绿蝇幼虫期和蛹期可溶性蛋白质组成及其含量检测的时间动态
Table 6.1 Development profile of hemolymph soluble proteins during the larval and pupal stages of *Lucilia sericata*

条带 标签	分子 量 (kDa)	幼虫日龄										蛹日龄						
		1.2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7		
A	230	0.11	0.18	0.35	0.33	0.34	0.4	0.38	0.23	0.34	0.35	0.3	0.26	0.25	0.25	0.21		
B	190	0.08	0.07	0.09	0.09	0.09	0.1	0.1	-	-	-	-	-	-	-	0.07		
C	174	0.07	0.06	0.08	0.08	0.09	0.08	0.08	-	-	-	-	-	-	-	-		
D	120	-	-	-	-	-	-	0.08	-	0.06	0.07	0.07	0.08	0.07	0.07	0.08		
E	100	-	-	-	-	-	-	0.08	-	-	0.07	0.07	0.07	0.08	-	-		
F	83	-	0.34	0.44	0.42	0.41	0.47	0.46	0.19	0.15	0.33	0.41	0.31	0.46	0.34	0.23		
G	81	-	0.94	1.14	1.1	1.1	1.09	1.06	0.69	0.64	0.82	0.87	0.78	0.93	0.77	0.64		
H	64	-	0.08	0.17	0.14	0.16	0.17	0.17	0.15	0.22	0.22	0.22	0.18	0.21	0.14	0.13		
I	53	-	0.07	0.11	0.1	0.11	0.11	0.11	0.07	0.1	0.11	0.16	0.14	0.19	0.12	0.1		
J	50	-	-	0.1	0.09	0.1	0.1	0.11	-	-	-	-	-	-	-	-		
K	45	-	-	0.08	0.08	0.09	0.13	0.14	-	0.08	0.11	0.12	0.11	0.15	0.09	0.08		
L	35	-	-	-	-	-	-	0.1	-	0.09	0.09	0.09	0.11	0.13	0.09	0.08		
M	28	-	-	0.1	0.09	0.09	0.09	0.09	-	0.08	0.1	0.11	0.09	0.11	-	-		
N	25	-	-	0.1	0.1	0.1	0.11	0.1	0.09	0.09	0.08	0.09	0.1	0.12	0.09	-		
O	22	-	-	0.16	0.16	0.15	0.13	0.14	0.13	0.09	0.09	0.09	0.08	0.1	0.09	-		
P	18	-	-	0.12	0.15	0.19	0.2	0.19	0.21	0.2	0.15	0.17	0.16	0.19	0.14	0.14		

注：“-”，未检测到。

第七章 肥须亚麻蝇幼虫血淋巴贮藏蛋白的纯化

昆虫血淋巴中含多种蛋白质, 贮藏蛋白(storage protein, SP)是其中的一大类。它主要由幼虫脂肪体合成, 释放到血淋巴中, 在幼虫末龄浓度达到顶峰, 于化蛹前被脂肪体选择性的重吸收, 形成高密度的脂肪体蛋白颗粒而使血淋巴中浓度下降, 而这些蛋白又在蛹发育的过程中用于成虫的营养。

贮藏蛋白最先在蝇类的血淋巴中发现 (Munn *et al.*, 1971), 其在幼虫末龄血淋巴中的急剧变化预示着它有用于蝇类幼期日龄推断的应用价值, 在前一章节, 我们对肥须亚麻蝇和丝光绿蝇的幼虫及蛹血淋巴蛋白质电泳结果已经明确 b 带和 G 带是贮藏蛋白, 所以有必要进一步明晰这一蛋白的变化趋势并探讨其用于法医昆虫学研究的可行性。对当然任何蛋白质进行深入研究之前, 都应该将其分离纯化。因此, 在本章, 我们对肥须亚麻蝇中的贮藏蛋白进行了纯化, 并在后文应用于不同日龄的测定。

1 材料与方法

1.1 虫源

肥须亚麻蝇虫源同第四章。饲养温度为 24℃。

1.2 血淋巴取样

将幼虫于产卵后 5 日龄的幼虫 200 头从果酱瓶中取出, 以蒸馏水漂洗数次, 用干净滤纸吸干水分。用解剖针小心刺破幼虫或用的体壁, 用毛细管吸取流出的血淋巴, 滴入加有少量苯基硫脲晶体的冰浴离心管中, 于 4℃ 以 12,000 rpm 离心 10 min, 取出中间清液, 置 -70℃ 冰箱保存备用。

1.3 贮藏蛋白的分离纯化

取上述血淋巴加等量 PBS (0.1 M Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , pH 6.5) 溶液, 于搅拌下逐滴加入与饱和硫酸铵至终浓度为 50% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4℃ 搅拌 30 min, 12,000 rpm 离心 10 min, 取上清, 于搅拌下逐滴加入与饱和硫酸铵至终浓度为 66% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4℃ 搅拌 30 min, 12,000 rpm 离心 10 min, 弃上清, 沉淀保存备用。

柱层析纯化以 Biologic DuoFlow™ 蛋白层析系统 (Bio-rad 公司) 进行, 具体步骤如下: 取上述沉淀, 用 2.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶解, 12,000 rpm 离心 10 min, 取上清液上疏水交换柱。疏水柱以 2.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 预洗, 流速为 2.0 mL/min, 样品上完后以 0.5 倍 2.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 预洗, 然后改用含 2.4~0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的缓冲液进行线性梯度洗脱, 流速 2.0 mL/min, 0.5 mL

/管进行收集。收集贮藏蛋白含量高的组分进行合并,上样于预先以 0.1 M PBS 缓冲液(pH 6.5)平衡的 P-100 凝胶柱,用同样的缓冲液洗脱,流速 0.5 mL/min,1 mL/管收集流出液。收集贮藏蛋白含量集中的组分,加入蒸馏水降低其电导率后,上样于预先经缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2)平衡的 UNOTM Q1 阴离子交换层析柱(7×35 mm, Bio-rad 公司),进行离子交换层析,样品上完后先用 2 倍体积的缓冲液 A 进行预洗,然后改用含 0~1.0 M NaCl 的 Tris 缓冲液进行线性梯度洗脱,流速 3.0 mL/min,1.0 mL/管进行收集。

每次纯化后样品经透析脱盐后,进行 SDS-PAGE 鉴定。

1.4 SDS-PAGE 电泳

样品加等体积 SDS 电泳样品缓冲液,上样。采用 Tris-甘氨酸电极缓冲液系统,以垂直平板电泳槽进行电泳。分离胶、浓缩胶浓度各为 10%和 4%,上样量为 10 μ l。浓缩胶和分离胶分别以 5 mA 和 15 mA 稳流电泳,电泳槽和电泳仪分别为 Bio-Rad 公司的 Mini-Protein III 和 Model 3000 Xi。电泳完毕后,凝胶以考马斯亮蓝染色 2 h 后脱色。脱色后,用 Bio-Rad 公司的 GS-800 光密度扫描仪扫描,并用 Quantity-one 软件分析各蛋白条带含量的变化。蛋白质分子量根据标准蛋白的分子量由软件直接计算得出。标准蛋白购自上海生物工程有限公司和 Bio-Rad 公司

2 结果

贮藏蛋白的分子量在上一章已经得到鉴定,分子量约为 81 kDa。在纯化过程均以此观察纯化效果。贮藏蛋白经 50~66%(NH₄)₂SO₄ 提纯后,样品杂带仍然较多(图 7.1),因此又进行了多步提纯。经疏水交换层析后,样品形成两个峰(图 7.2),第一个峰为含贮藏蛋白的主峰,但在 30 kDa 左右一条带含量甚高(图 7.3),而后又经 P-100 凝胶层析对样品进行分子量分级分离(图 7.4),图 7.5 结果显示,贮藏蛋白已经得到较好的纯度,30 kDa 的蛋白已经被分开,但分子量较高的蛋白依旧存在,最后样品经具有高分辨率的阴离子交换柱 Q-1 再次分离,其结果如图 7.6 所示,最后一个峰是相当纯净的蛋白,经 SDS-PAGE 鉴定,图 7.7 显示该峰为纯的贮藏蛋白。经含量检测,最后得到的蛋白含量约为 10 mg。

3 讨论

由于贮藏蛋白在昆虫的整个可溶性蛋白中占有很高的比例,幼期在血淋巴中,因此要得到的蛋白的纯度就要比一般含量较少的蛋白明显要低。如 Tojo 等(1980)对家蚕贮藏蛋白的纯化就相当繁琐,他们先进行了热处理和(NH₄)₂SO₄ 沉淀,之后对沉淀又进行了阳离子交换层析和阴离子交换层析最后才得到 10 mg 蛋白。而另一组研究人员(Levenbook & Bauer,

1980) 则对红头丽蝇贮藏蛋白的纯化也是如此, 他们在 70%(NH₄)₂SO₄ 沉淀后, 又分别进行了凝胶过滤层析和阳离子交换层析最后才得到纯品。而本文在进行了(NH₄)₂SO₄ 沉淀之后, 由于样品只需稍处理就可上疏水柱, 因此也进行了这一步的尝试, 发现效果不是特别明显但杂蛋白仍有减少, 而 30 kDa 的蛋白也同时得到了富集, 由于该蛋白不是本研究的重点, 故未对此深入。

在用 P-100 对贮藏蛋白分离后, 发现它与其他高分子量的蛋白混杂在一起, 由此可见, 在肥须亚麻蝇中贮藏蛋白也是一种寡聚蛋白, 其亚基的分子量就是我们测定的 81 kDa。一般认为, 贮藏蛋白是单体分子的六聚体, 可见天然的贮藏蛋白分子量近似于 500 kDa 左右, 这与先前对大部分贮藏蛋白的分子量估计是一致的。当然, 贮藏蛋白六聚体的特点, 就更有利于其贮藏营养。

前人的研究往往会对储藏蛋白的性质加以关注, 比如氨基酸组成等, 而本文研究的重点在于拿到纯的贮藏蛋白用于下一步抗体的制备, 故没有测定其氨基酸组成, 若研究的焦点在于贮藏蛋白的来源及其趋向, 则必须研究。

本文最终得到的纯化样品纯度较高, 表明其已可用于抗体制备。

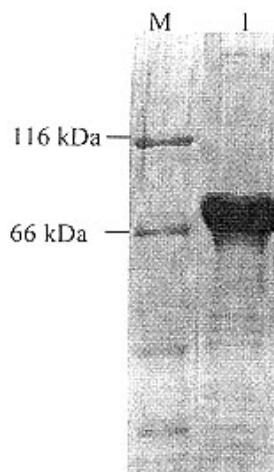


图 7.1 经硫酸氨沉淀的血淋巴样品纯度鉴定

注: M, 低分子量 Marker; 2, 50%~66%硫酸氨沉淀样品

Fig 7.1 SDS-PAGE profile of hymolymph conducted with 50%~66% (NH₄)₂SO₄ precipitation

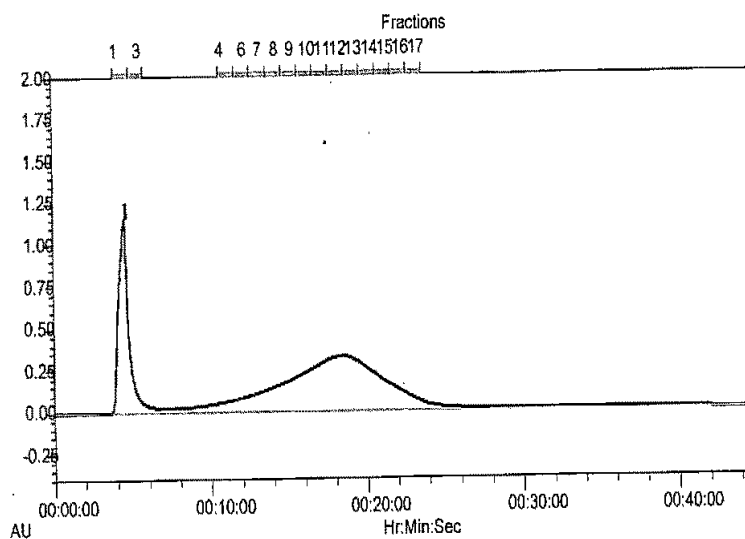


图 7.2 硫酸氨样品经疏水层析
注：1，收集主峰

Fig 7.2 Sample of 50%~66% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation purification with Hydrophobic Interaction Chromatography

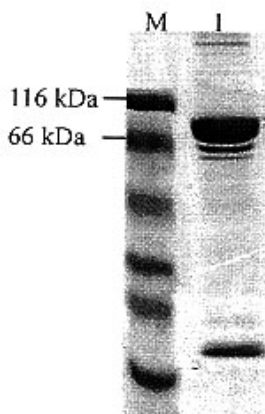


图 7.3 硫酸氨样品经疏水交换层析后 SDS-PAGE 鉴定
注：1，图 2 收集主峰

Fig 7.3 Sample purification of hydrophobic interaction chromatography identification with SDS-PAGE

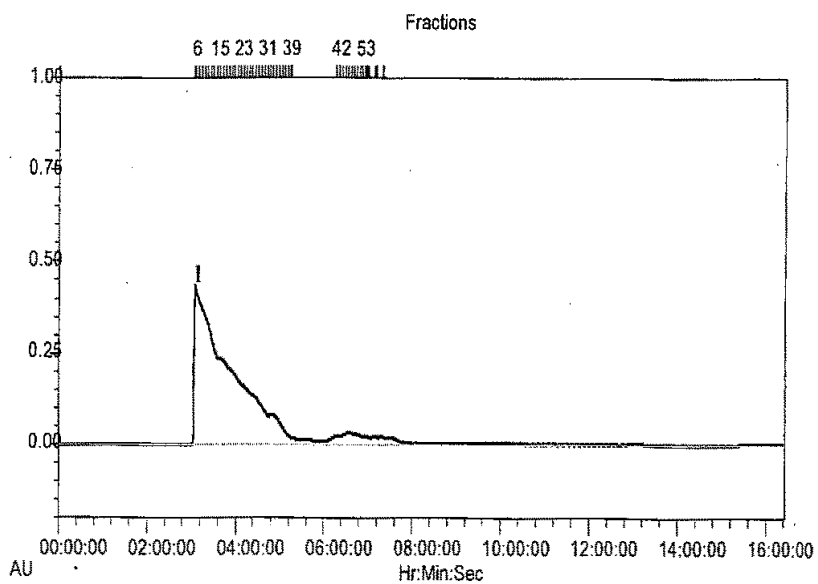


图 7.4 疏水层析后样品经 P-100 凝胶过滤层析

注：1, 收集主峰

Fig 7.4 Sample purification with gel filtration chromatography after hydrophobic interaction chromatography

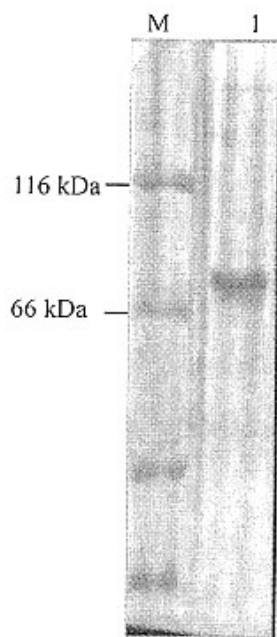


图 7.5 P-100 经 P-100 凝胶过滤层析的 SDS-PAGE 纯度鉴定

注：1, 收集主峰

Fig 7.5 SDS-PAGE after gel filtration chromatography purification

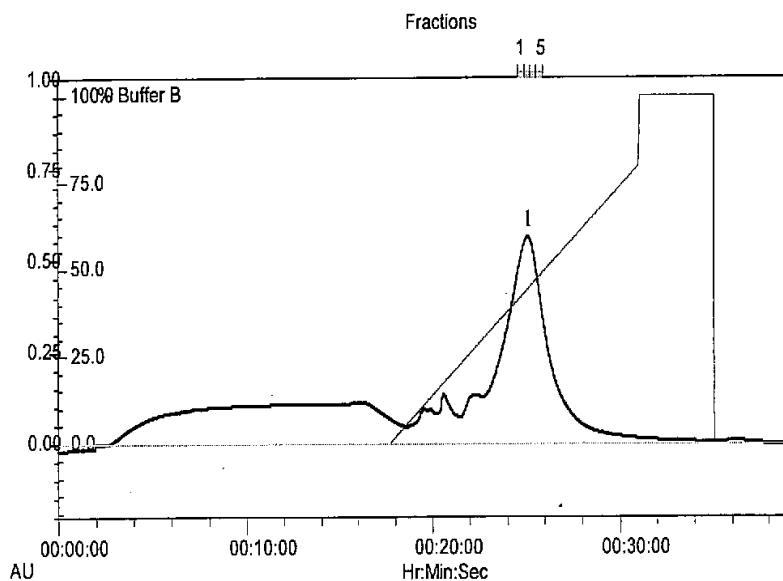


图 6 P-100 凝胶过滤层析后样品经 Q-1 阴离子交换层析

注：1,收集主峰

Fig 7.6 Sample purification with ion exchange chromatography after gel filtration chromatography

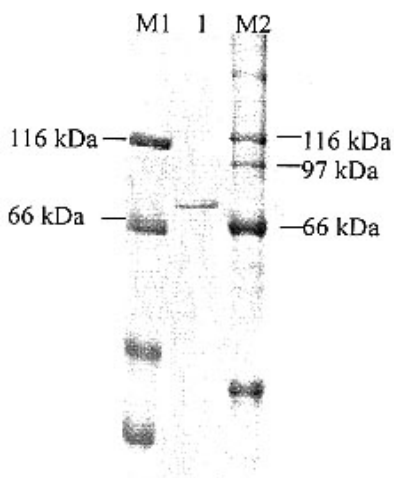


图 7.7 经 Q-1 阴离子交换层析后样品的 SDS-PAGE 纯度鉴定

注：1,收集主峰

Fig 7.7 SDS-PAGE after ion exchange chromatography purification

第八章 贮藏蛋白抗体制备与 ELISA 检测最佳反应条件建立

已有许多研究人员通过各种不同的方法估测了部分昆虫体内贮藏蛋白的含量。Munn 和 Greville (1969)恰当的运用超离心方法测定了红头丽蝇贮藏蛋白的含量；Kinnea 和 Thomson(1975)根据 PAGE 电泳对丽蝇 *Calliphora stygis* 的各种贮藏蛋白进行了总体评价；Sekeris 和 Scheuller (1977)通过 SDS-PAGE 凝胶光密度测定法估计出红头丽蝇贮藏蛋白的含量；而 Tojo 等 (1978,1980)运用定量免疫扩散法估计了惜古比天蚕蛾 *Hyalophora cecropia* 和家蚕 *Bombyx mori* 贮藏蛋白的相对浓度。在提纯获得抗体后，比较精确的方法有免疫电泳 (Laurell, 1972; Roberis *et al.*, 1977; Levenbook *et al.*, 1980; Kramer *et al.*, 1980) 检测和 (Rimoldi *et al.*, 1996) 用 ELISA 方法对不同发育阶段的 *Triatoma infestans* 贮藏蛋白含量的测定。他们的结果表明贮藏蛋白随发育变化呈现一定的规律，即有可能用于昆虫日龄推断。

因此，继前一章获得纯化的贮藏蛋白后，本文将通过制备其特异性抗体，探讨其用于贮藏蛋白含量检测具体条件。

1 材料与方法

1.1 抗体制备

1.1.1 实验动物

本试验选用 4~6 月龄，体重 2 公斤，健康的雄性新西兰大白兔用于免疫。(由浙江医学院实验动物中心饲养)。

1.1.2 免疫抗原的乳化和免疫方案

取前章纯化的贮藏蛋白作为免疫抗原。免疫剂量为：第一次 1.0mg/kg，第二、三次 1.5 mg/kg，最后一次采血前一周进行静脉注射免疫，剂量为 0.5 mg/kg。用生理盐水分别稀释到适当浓度，再与等体积的佐剂充分乳化（第一次免疫时用福氏完全佐剂，第二、三次免疫时用福氏不完全佐剂，静脉注射不加佐剂），直至滴入水中不分散。第一次免疫后 3 周进行加强免疫，以后每隔 2 周加强一次，共免疫 4 次。

1.1.3 试血与采血

第二次加强免疫后第 8 天，兔耳缘静脉采血 1 ml，装于试管中，于 37℃ 水浴静置 30 min，待血液凝固后，针剥离血球与试管壁，再置 4℃ 冰箱过夜，离心 5 min (4000 rpm)，取上清液作倍比稀释，间接 ELISA 法测定抗血清的效价。待效价达到 1: 100,000 就采全血（采用颈动脉放血法）。

1.2 免疫印迹

取用 PBS(pH 7.4)1:40 稀释的三龄幼虫血淋巴, 加等体积的 2×SDS-PAGE 上样缓冲液 (0.1 M Tris-Cl pH6.8, 20%甘油, 4%SDS, 0.05%溴酚蓝, 10%巯基乙醇), 沸水浴煮沸 5 min 后, 12,000 rpm 离心 5 min 取上清进行 SDS-PAGE 分析。电泳方法同第 4 章。

蛋白样品经 SDS-PAGE 后, 取与分离胶相同大小的 PVDF 膜、3 MM 滤纸在转移缓冲液 (Tris 25 mM, 甘氨酸 192 mM, 20%甲醇) 中平衡 15~20 min, 在半干转膜仪中进行转膜, 带样品的 PVDF 膜用脱脂奶粉(5% Non-fat milk in 1×TBS, 2‰ Tween-20)室温封闭 2 h, 以洗涤液 (2‰ Tween-20 in 1×TBS) 洗涤 1~2 次; 一抗经 TBST(TBS, 2‰ Tween-20)稀释至合适浓度与 PVDF 膜室温反应 2 h 或 4℃反应过夜, PVDF 膜用洗涤液洗涤 3 次, 每次 10 min, 碱性磷酸酶酶 (AP) 标记二抗经 TBS 稀释后与 PVDF 膜室温反应 2 h, 洗涤液洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入 10 ml AP 底物(NBT+BCIP)显色。溶液覆盖于 PVDF 膜上显色, 待阳性条带显示后加入硫酸中止反应, PVDF 膜自然干燥后拍照。

1.3 抗体纯化与效价测定

采用 Millipore 试剂盒 Montage Antibody Purification PROSEP®A 纯化抗体。具体方法见试剂盒说明书。纯化的 IgG 经稀释后, 测定其效价为 1: 10,000, 并分装成小份保存于一 70℃

1.4 抗原和包被抗体最佳稀释倍数确定

抗原为三龄幼虫匀浆液上清。以 pH9.6 的碳酸盐缓冲液将抗原 1: 1000、1: 2000、1: 4000 和 1:8000 倍比稀释, 37℃2 h, 100 μl/孔包被; 然后用含 0.05%吐温 20 的 0.05 mol/L TBS(简称 TBST, PH 为 7.2)洗 5 min X 3 次, 加入含 1%脱脂奶粉的 TBS, 100 μl/孔, 37℃封闭 2 h; TBST 洗 5 min X 3 次, 稀释抗体分别 1: 100、1:200、1: 400、1: 800、1:1600、1:3200 稀释, 100 孔, 37℃2 h, 100 μl/孔, 进行方阵试验; 再用 TBST 洗 5 min X 3 次, 每孔加 1: 2,000 稀释的酶标抗体(羊抗兔二抗, 华美公司)100 μl/孔, 37℃ 2 h; TBST 洗 5 min X 3 次, 加入 AP 底物溶液 100 μl, 37℃ 30 min; 用 2 M 的 H₂SO₄ 50 μl/孔进行终止后酶标仪 OD₄₀₅ 读数, 每个稀释度重复一次, 取其平均值。

1.5 标准曲线

标准溶液来自纯化蛋白稀释液。抗体稀释倍数选择根据 1.4 结果, 标准蛋白分别稀释 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 倍。ELISA 程序同上, 每个稀释度重复三次, 阴性对照加入脱脂奶粉。

2 结果

免疫结果显示, 肥须亚麻蝇和棕尾别麻蝇血淋巴都对贮藏蛋白抗体有明显的阳性反应, 且特异性很好, 图 8.1 显示抗体只对贮藏蛋白有阳性反应, 因此可以用于 ELISA 检测贮藏蛋白的含量。

方阵试验如表 8.1 所示, 随着抗原和抗体稀释倍数的增大, 随着抗原、抗体稀释倍数的增大, 其 OD 值逐步减小。抗原稀释倍数的逐渐变大, OD 值逐渐降低。当抗原以 1: 1600、抗体以 1: 1600 稀释时, OD 值为 1.031, 约等于 1, 故选择该稀释倍数为最终检测的工作浓度。

图 8.2 显示, 标注曲线线性关系良好, $R^2>0.9$ 。根据 P/N (阳性/阴性) 值 >2 来判断, 抗原的最低检测限为纯化抗原稀释 3200 倍。

3 讨论

在抗血清制备过程中, 笔者发现效价上升较慢, 只在静脉注射后才急剧上升, 笔者推测可能是贮藏蛋白和哺乳动物的某蛋白有较大的同源性所致。

血淋巴印迹结果表明, 在肥须亚麻蝇和棕尾别麻蝇幼虫血淋巴中其贮藏蛋白的分子量是一致的, 且各只有一个条带, 说明在前一章制备的贮藏蛋白是很纯的蛋白。因此获得的抗体完全可以用于后续的检测。同时为了提高检测的特异性, 我们又利用试剂盒对抗血清进行了纯化, 获得了纯的 IgG (文中未显示), 它的纯度原高于一般的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀。

由于酶标二抗的稀释是根据说明书进行, 文中未对此加以研究。而方阵滴度结果表明 OD 值的大小同时依赖于抗原稀释倍数和抗体稀释倍数, 一般的, 我们选择了 OD 值为 1 附近的结果作为工作浓度, 而这一抗原稀释浓度比 Rimoldi 等 (1996) 的稀释倍数要低一个数量级, 但他们是直接加入抗血清来检测, 所以情况有所不同。

标准曲线的线性关系是否良好直接关系到接下来, 能否用于 ELISA 检测, 本文的结果表明, 采用间接法来检测抗原是可行的。

表 8.1 抗体抗原稀释倍数方阵试验
Table 8.1 Checkboard titration testing of antibody and antigen

抗体稀释倍数	抗原稀释倍数				
	100	1000	2000	4000	8000
100	2.652	1.781	1.472	1.022	0.622
200	2.567	1.65	1.391	0.941	0.541
400	2.493	1.487	1.287	0.837	0.532
800	2.339	1.456	1.145	0.765	0.395
1600	2.223	1.245	1.031	0.687	0.379
3200	2.109	1.115	0.925	0.573	0.355

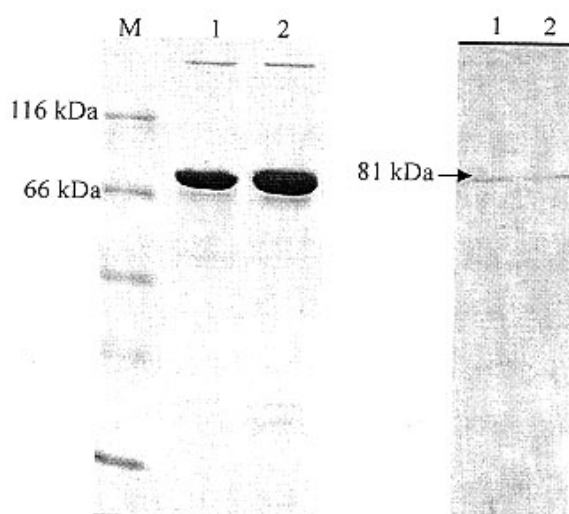


图 8.1 肥须亚麻蝇和棕尾别麻蝇血淋巴 Western 印迹

注：1，肥须亚麻蝇 4 日龄幼虫；2，棕尾别麻蝇 4 日龄幼虫；M，标准分子量。

Fig 8.1 Western blot profile of hymenolymph of *Boettcherisca peregrine* and *Parasarcophaga crassipalpis* with antibody of storage protein

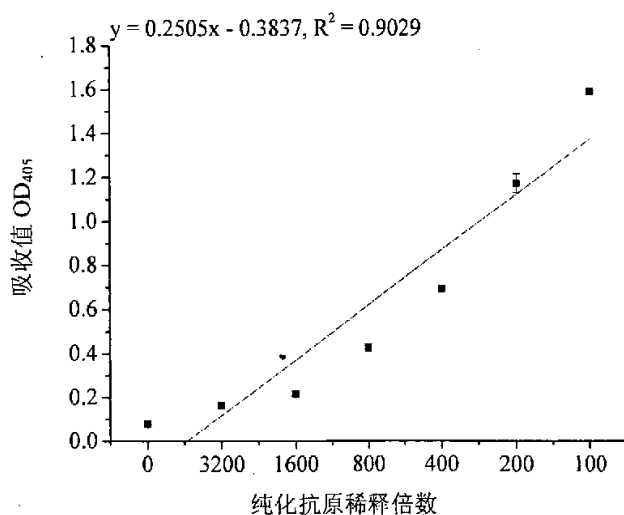


图 8.2 纯化贮藏蛋白为包被抗原制作的标准曲线

Fig 8.2 Standard curve with storage protein as coating antigen

第九章 两种麻蝇体内贮藏蛋白含量及温度对其的影响

昆虫体内血淋巴蛋白的含量能在短期内急剧增加是令人十分惊讶的事,而其中贮藏蛋白的变化则更加剧烈。贮藏蛋白的这种量变在多种昆虫里得到了细致的研究,如对烟草天蛾的研究结果表明,在幼虫的蜕皮过程中,存在贮藏蛋白增加的趋势,而在蜕皮后降低到一定的水平(Kramer *et al.*, 1980)。同样也发现家蚕(Toja *et al.*, 1981)、Hyalophora(Telfer *et al.*, 1983)和舞毒蛾(Karpells *et al.*, 1990)的贮藏蛋白在幼虫蜕皮后有减少的现象。贮藏蛋白的这种变化是否有应用于昆虫日龄鉴定的价值呢,本文就将这一问题展开这方面的研究,并考虑了温度对其发育的影响。

1 材料与方法

1.1 昆虫饲养与取样

昆虫的种类为肥须亚麻蝇和棕尾别麻蝇来源、饲养方法和取样同第四章,共设置5个温度,分别为16、20、24、28和32℃。另外在自然温度条件下,同前面方法取样,温度记录采用自动记录仪(浙江大学仪表厂)。每日龄各取10头。

1.2 间接 ELISA 法测定贮藏蛋白含量

1.2.1 抗原制备

取单个幼虫或蛹加入500 μ l TBS(0.01 M Tris, 0.9%NaCl, pH 7.2)迅速匀浆12,000 rpm离心10 min,取上清液备用。

1.2.2 含量检测

以pH9.6的碳酸盐缓冲液将抗原稀释2000倍,37℃2 h,100 μ l/孔包被;然后用含0.05%吐温20的0.05 mol/L TBS(简称TBST, PH为7.2)洗5 min X 3次,加入含1%脱脂奶粉的TBS,100 μ l/孔,37℃封闭2 h;TBST洗5 min X 3次,稀释抗体2000倍,37℃2 h,100 μ l/孔,再用TBST洗5 min X 3次,每孔加1:2,000稀释的酶标抗体(羊抗兔二抗,AP标记,上海华美公司)100 μ l/孔,37℃2 h;TBST洗5 min X 3次,加入AP底物溶液100 μ l,37℃30 min;用2 M的H₂SO₄50 μ l/孔进行终止后,酶标仪OD₄₀₅读数。每头虫子重复测3次。每日龄重复6次。

标准曲线制作同前一章,为了减少加样上的误差,每块酶标板均制作标准曲线。

1.3 数据分析

数据的统计分析采用 SPSS 13.0 软件, 作图用 Origin 7.0 软件处理。

2 结果

2.1 不同温度下两种麻蝇幼虫期和蛹期贮藏蛋白和日龄的关系

各温度下幼虫贮藏蛋白含量的时间动态如图 9.1 和 9.2 所示。结果表明, 各温度下, 幼虫贮藏蛋白在幼虫期初期随着日龄增加而显著增加, 到达幼虫最大值后, 在此后各日龄中贮藏蛋白含量稍下降。但幼虫贮藏蛋白达到最大值的时间随着试验温度的降低而延长。用改进的 Logistic 曲线对不同种类不同温度下的贮藏蛋白含量与日龄关系进行拟合, χ^2 检验显示, 各个回归方程均显著适合。

各温度下蛹贮藏蛋白含量的时间动态如图 9.3 和 9.4 所示。结果表明, 各温度下, 幼虫贮藏蛋白含量在蛹初期稍上升至蛹期最大值, 但温度越低所需时间越长。此后各日龄中贮藏蛋白含量稍下降, 置蛹期末期下降加快。用改进的 Logistic 曲线对不同种类不同温度下的贮藏蛋白含量与日龄关系进行拟合, χ^2 检验显示, 各个回归方程均显著适合。

2.2 自然温度下肥须亚麻蝇日龄的推断

日龄的推断首先要将各日龄虫的贮藏蛋白含量测出, 然后根据其平均发育温度, 参照与其最近的恒温下的拟合方程, 查出对应的日龄值。推测的结果见表 9.1, 结果表明, 对于幼虫日龄的推测是较为准确的, 除 5 日龄虫体内的贮藏蛋白含量与既介于 2 日龄与 3 日龄之间, 又符合 5 日龄外, 其他日龄均能准确推测, 误差不超过 0.5 d; 对于蛹日龄, 由于蛹期贮藏蛋白变化不是很大, 且又有一个上升的过程, 因此仅仅根据贮藏蛋白含量来推测, 常常会有两个数值, 但至少其中一个是准确的。

3 讨论

贮藏蛋白的含量在昆虫体内占到很大的比例, 以红头丽蝇为例(Levenbook & Bauer, 1980), 到 3 龄时可占到血淋巴总可溶性蛋白的 50%以上, 化蛹期有所下降, 稳定在高峰时的 75%左右。在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Roberis *et al.*, 1977) 和红头丽蝇(Levenbook & Bauer, 1980) 中, 其幼虫贮藏蛋白的滴度在停止取食时达到最高, 而到了羽化时, 则明显下降, 这与我们测到的结果是相符合。

研究表明, 不同温度下, 贮藏蛋白含量在蝇类的生长发育过程中呈现类似的变化趋势。贮藏蛋白在幼虫初期随着幼虫取食量的增大而迅速增加, 随着离食期的到来, 各个指

标又逐渐下降，这与王江峰等（2001）对体长的研究结果相一致。其规律性的变化表明，贮藏蛋白含量的 ELISA 检测有应用于蝇类幼虫日龄推断的潜力。

我们只是建立了不同恒温下贮藏蛋白含量与日龄的模拟方程，对于实际应用最好是可以能建立和温度的三者关系的方程，但从本文来看，困难甚大。不过这并不妨碍我们对于日龄的推测，在法医昆虫学实际应用中，通常根据发育平均温度并参照与之最近的恒温拟合方程，由此可近似的推断出虫子的日龄。从本文的结果来看，这一方法是相当可靠的。

根据笔者的经验看来，仅用多抗采用 ELISA 方法来检测贮藏蛋白含量其规律性，还是相当明显的。但是从法医实践来讲，一个贮藏蛋白的单抗对于制备检测贮藏蛋白含量的试剂盒是必不可少的。

表 9.1 自然温度下肥须亚麻蝇的日龄推测

Table 9.1 Age estimating of *Parasarcophaga crassipalpis* reared under natural temperature

日龄	贮藏蛋白含量 (μg)	平均发育温度	日龄推测值
L2	622.431	25.4	2.01
L3	1530.411	25.6	3.01
L4	1407.607	25.5	3.5
L5	1174.408	25.7	4.4/2.1
P0	1046.896	26.0	0.43
P1	1167.976	26.3	2.01
P2	1584.563	26.5	2.16/2.64
P3	1570.287	26.7	2.15/2.69
P4	1392.494	27.0	2.11/3.41
P5	1170.027	27.2	2.06/4.32

注：Ln 为幼虫产下后第 n 日龄，Pn 为蛹期化蛹后第 n 日龄，如 P0 为初化蛹。

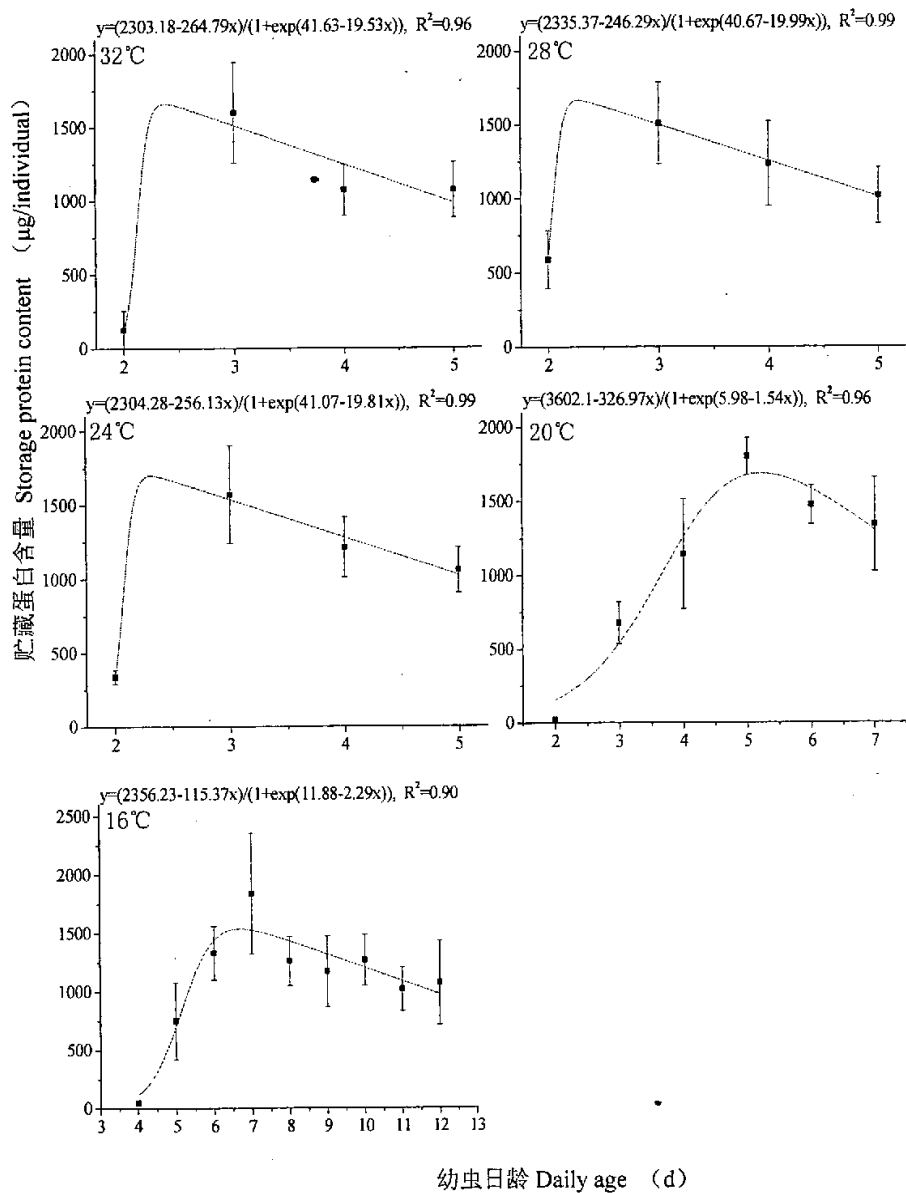


图 9.1 肥须亚麻蝇幼虫期贮藏蛋白含量与日龄的关系

Fig 9.1 Relationship of storage protein and age of larvae of *Parasarcophaga crassipalpis*

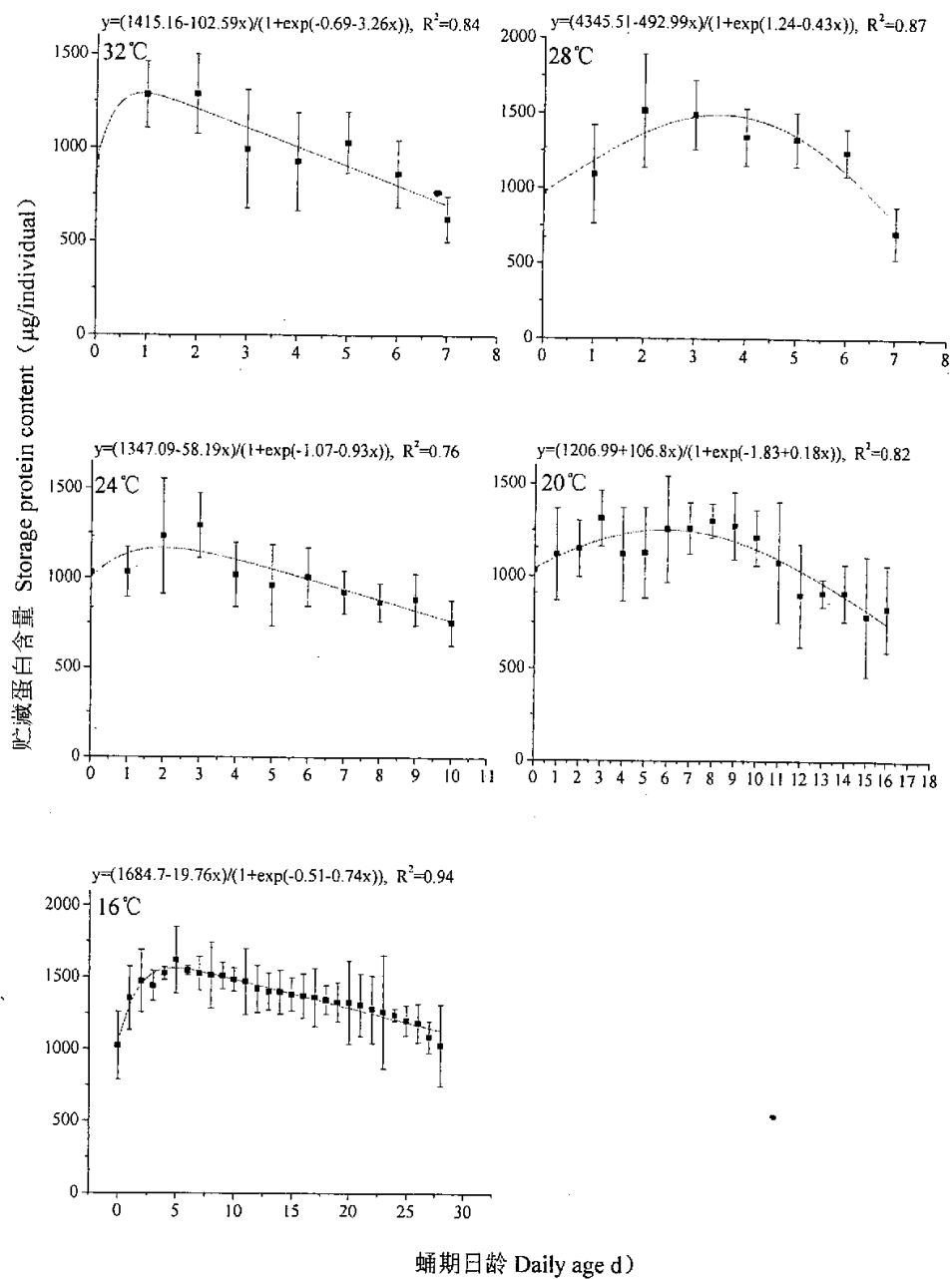


图 9.2 肥须亚麻蝇蛹期贮藏蛋白含量与日龄的关系

Fig 9.2 Relationship of storage protein and age of pupae of *Parasarcophaga crassipalpis*

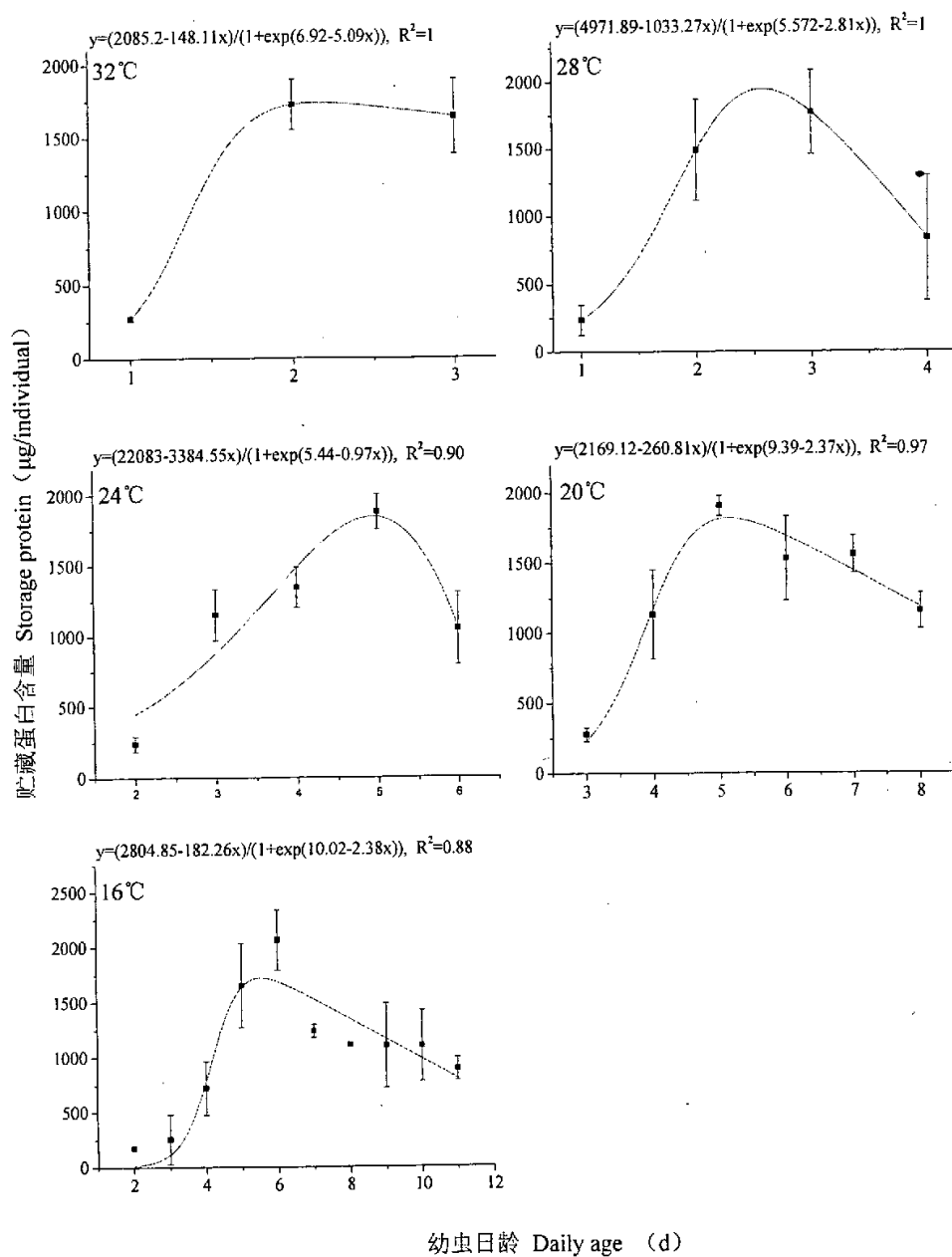


图 9.3 棕尾别麻蝇幼虫期贮藏蛋白含量与日龄的关系
Fig 9.3 Relationship of storage protein and Daily age of larvae of *Boettcherisca peregrina*

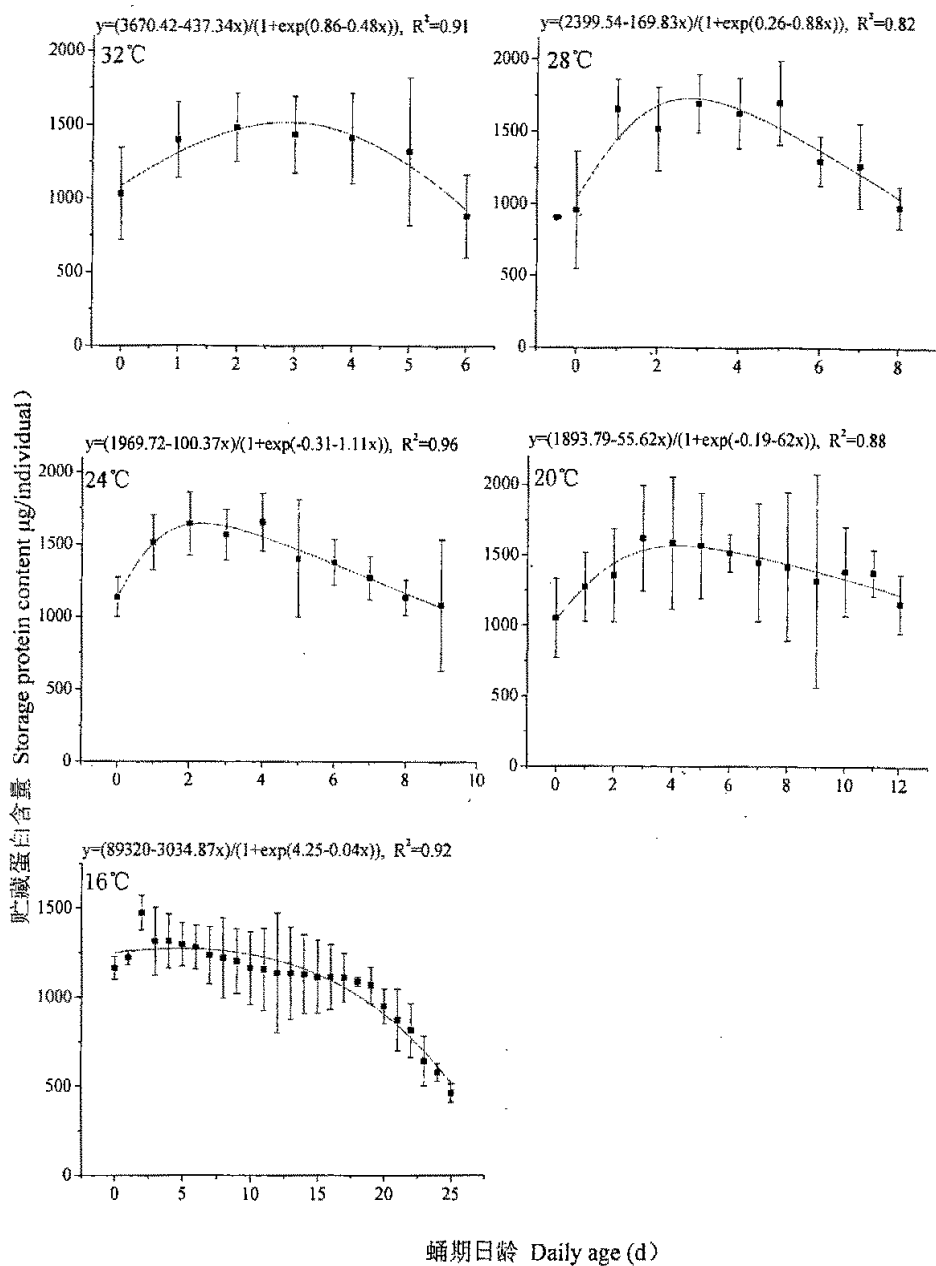


图 9.4 棕尾别麻蝇蛹期贮藏蛋白含量与日龄的关系

Fig 9.4 Relationship of storage protein and age of pupae of *Boettcherisca peregrina*

第十章 总讨论

以各种大型精密仪器及其相关应用技术为基础的现代分析测试技术,是融合多学科、多技术的一系列极重要的实验手段,并正逐渐形成一门新兴的边缘学科。它准确、快速、自动化,优点多而明显,应用非常广泛。随着生物技术的迅速发展,包括 DNA 高通量测序,蛋白质组学等在内的分子检测技术先后建立、发展。目前,无论是现代分析测试技术,抑或分子检测技术,都已在法医昆虫学中实际应用。但如何把他们整合成一个整体或者一套规范仍然任重而道远。下文就笔者学位论文阶段所做的工作作一个总结,主要就法医昆虫学中的两大问题展开讨论,盼能给后来者以启发。

1 种类的鉴别

1.1 DNA 分析技术

在利用昆虫进行死后间隔时间的判断中,其中首要的难题是蝇类等昆虫幼期的种类鉴定。它们往往需要饲养至成虫才能作可靠的鉴定,这样,势必延迟了若干天,以至若干周。与此同时,饲养还有失败,即幼虫等中途死亡的问题,那有可能造成无法鉴定的后果。总之,实际工作中迫切要求在犯罪现场采得昆虫之后,能够立即作出既快速又可靠的鉴定。

Mt DNA 序列测定目前已是法医昆虫学中研究鉴定昆虫种类的主要方法,关于这一方法的文献已在文献综述中详细阐述。这一方法的优点是法医工作人员无需专业的昆虫学知识,只要具备法医 DNA 鉴定实验室的条件即可开展。如果实验室具备测序条件,一般一天之内就可以鉴定昆虫的种类,当然前提条件是该虫的 DNA 序列已经存放到 GenBank 中。这就引出了一个问题,法医昆虫学家们必须把所有可能在尸体上出现的昆虫都进行 DNA 测序。这一工作是必须的也是漫长的,就我们的工作而言,目前仅就杭州地区尸体上最常出现的尸食性蝇类进行了测序,对实际工作而言,可能是远远不够的。

DNA 测序的另外一个问题是地理种群的差别,如 Wells 等(2002)对夏威夷特有的丽蝇科 *Dyscritomyia* 属进行的分子系统学分析和 Stevens 等(2002)则通过分析 28S rRNA 与 mt DNA 序列,得出的夏威夷 *Lucilia* 绿蝇属的进化关系。这一工作就需要研究人员在本地区采集足够的代表性样品,进行重复测序。同样,作者在第一章中也对这一问题进行了探讨,发现杭州地区的丝光绿蝇的 DNA 和世界上其他地区的 DNA 差异很小,目的片段的核苷酸序列差异只有一个。可见在法医昆虫 DNA 鉴定中地理种群的差别是相当微小的,大量的工作应集中于建立种间差别的数据库。

其他 DNA 技术如 RAPD, 因为其方法的不稳定性造成不同实验室结果的难以重复性, 导致其无法形成一个标准, 一旦在实践中应用该法, 工作人员将难以找到相应的参照物用来比较而无法鉴定。因此, 笔者认为 DNA 序列测定是目前唯一具备现实可行性的 DNA 分析方法。其他更有效的方法, 有待于基因芯片等新技术的成熟和应用。

DNA 分析技术在法医昆虫学研究中的另一个热点领域是对蝇蛆或其他食用了人类 DNA 的昆虫肠道内容物的检测, 该方法已经能够对离开食物 2^o 天以内蝇蛆的食物来源准确的鉴定出来, 而本文则着重于温度对其检测概率的影响, 将给实际应用带来极大的方便。

1.2 蛋白质组技术

自 1994 年澳大利亚学者 Williams 和 Wilkins 首先提出与基因组相对应的“蛋白质组”概念, 并开始从整体蛋白质水平研究生命现象以来, 蛋白质组研究在国际上进展十分迅速, 不论是基础理论, 还是技术方法, 都在不断的进步和完善。许多中细胞的蛋白质组数据库已经建立, 众多的生物制药公司在巨大的商业利益的诱惑下纷纷加入蛋白质组研究。目前我国的蛋白质组研究计划也已经成立, 大量的资金和设备投入其中, 可谓来势汹汹。

从我们的研究结果来看, 不同种类间的蛋白质组图谱的差异是相当显著的, 这一点是明显的, 单就不同个体间就有相当的蛋白质组变化, 更何况是种间。但是, 在鉴定幼虫方面有一个问题就是, 如何保证样品制备过程中的纯净。所以取食的昆虫是无法作为鉴别的样品, 因此, 笔者选择了初孵幼虫作为研究的对象。但是由于财力的限制, 本研究并未对蛋白质点进行质谱鉴定分析。在财力允许的情况下, 如能对其中的蛋白点进行测序, 将得到许多有用的信息, 尤其是可以作为 DNA 测序的靶标。

蛋白质组研究的另一个方向是可以用于比较不同发育时间组织的蛋白组成。作者在这方面进行了较多的尝试, 遗憾的是, 蝇类幼虫的贮藏蛋白含量太高, 如提高样品浓度则贮藏蛋白掩盖了其他低浓度的蛋白, 而且由于其高浓度, 导致聚焦结果很差, 图谱难以分析。在这一方面, 作者认为一个可以解决的方法是先除去血淋巴中的贮藏蛋白, 笔者尝试的具体做法是利用免疫沉淀技术。但是, 这样的过程容易丢失很多目标蛋白, 而且由于贮藏蛋白含量很高, 常规免疫沉淀技术不足以承担其这一责任, 最后得到的电泳图谱也是跟前面相同的。象血液蛋白质组研究中样品制备中一样, 有一种可以直接离心去除白蛋白的方法的话, 或许是可行的。

2 蝇类幼期日龄推断

在日龄推断方面, 前人尝试了形态学、体重、体长、尿酸、嘌呤、表皮碳氢化合物等方

法来推断蝇类的日龄,奈何这些指标都是连续变化的过程,而且在蝇类幼期的发育过程中常有起伏,因此,就单一指标而言都不是完美的。因此,笔者在研究过程中尝试了建立多个指标的模拟方程,以供法医实践中,综合鉴定。

蛋白质、糖类和脂类在生命活动中是起着及其重要的作用,它们在发育过程中的动态变化直接反映了昆虫发育进程。本文的结果表明这些成分的变化在蝇类幼期的发育过程中呈现一定的规律,这种规律在某种程度上和形态学的变化是相关的。如含量骤升时,往往昆虫取食量最大的时期,这一过程中,其体重也发生这剧烈的变化,而当这一过程截至时,昆虫往往停止取食,导致其体重显著下降,生化成分也相应的下降。幼虫的这一过程往往可以用改进的 Logistic 曲线进行拟合,拟合方程即可用于实践中。人们可以先测出含量,然后根据含量反过来推测日龄。

而研究昆虫血淋巴可溶性蛋白组成的文章可谓不计其数 (Kim *et al.*, 1989; Koopmanschap *et al.*, 1992; Anscin *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1997; Shimoda *et al.*, 1997; Yoshiga *et al.*, 1998), 这些研究可以作为借鉴。因此我们也开展了这方面的工作,结果表明肥须亚麻蝇和丝光绿蝇血淋巴可溶性蛋白的组成在幼虫期和蛹期有着显著变化,有应用于法医实践的潜力。但是具体到应用于,对于一个未知日龄的虫子,往往无从比较,因为我们在比较血淋巴可溶性蛋白组成的时候是计算胶内的相对含量,没有给出一个绝对值,因此,笔者想到如能对一种的一两种蛋白制成抗体来检测,则显然能够解决这一问题。

在研究肥须亚麻蝇电泳图谱的时候结合前人的研究,我们发现其中的贮藏蛋白含量很高,纯化相对容易,因此把它作为抗原来制备抗体。对于含量高的蛋白,纯化过程中不容易丢失,但获得高纯度蛋白则往往不易。在我么的研究中,尝试了多种方法,最后得到了约 10mg 蛋白,并制备了多克隆抗体。当然如能制备单克隆抗体的话,后续的检测结果会更佳。

利用 ELISA 方法的研究结果表明,不同温度下,贮藏蛋白含量在蝇类的生长发育过程中呈现处类似的变化趋势。贮藏蛋白在幼虫初期随着幼虫取食量的增大而迅速增加,随着离食期的到来,各个指标又逐渐下降,这与王江峰等 (2001) 对体长的研究结果相一致。他们规律性的变化表明,贮藏蛋白含量的 ELISA 检测有应用于蝇类幼虫日龄推断的价值。而我们对自然温度下生长的肥须亚麻蝇的贮藏蛋白含量检测后,反推其日龄时发现,在幼虫日龄的鉴别时相当有效,尤其是在幼虫 3 龄时,可以说是一个相当方便的解决之道。

当然,一般而言生化检测的方法,其结果变异度稍大,而我们在检测 ELISA 过程中发现,其变异度远小于其他生化成分的测定。因此,如能得到单克隆抗体制成试剂盒,该方法将如虎添翼,必能在刑事侦查中发挥其独到的作用。

3 结 语

就法医昆虫学而言,由于其是一门交叉学科,在相当程度上依赖于技术的进步。就目前而言,笔者认为,现有的形态学指标和生化指标(包括本文的指标)已经能够满足现实的需求。其他更精确的方法有待于其他新技术的成熟,如生物芯片对于昆虫鉴别,蛋白质芯片对于日龄推断的应用。

2002年5月在法国 Rosny Sous Bois 举行第一次欧洲法医昆虫学研讨会时创建了欧洲法医昆虫协会(European Association for Forensic Entomology, EAFE),第一年度北美法医昆虫学大会(North American Forensic Entomology Conference, NAFEC)(朱家颖等,2005)于2003年8月7-9日在内华达州拉斯维加斯顺利举行。他们不约而同的提到了法医昆虫学的教育推广及职业培训日益的重要性。或许法医实践的规范化和推广已经是当前国内最为重要的工作。

Abstract

This dissertation is to build a molecular method to identify flies species of forensic importance and a quick way to determine flies age using biochemical character of necrophagous flies. The results were shown as follows:

1. common species identification by a DNA-based approach

Identifying an insect specimen is an important first step in a forensic-entomological analysis. However, diagnostic morphological criteria are lacking for many species particularly in their immature stage. We demonstrate a method for using mitochondrial COII gene sequences analysis to identify six common specimens of the flies likely to be collected from a human corpse in Hangzhou, China, based on two year surveys of the seasonal occurrence of carrion-breeding flies. The sequences of *Lucilia sericata* from the Genbank were used in comparing with different geographical populations. This technique also provides clear results when applied to the identification of the larvae.

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

With the application of 2-DE technology in biology science, the importance of constructing a proteome map is to be considered. Four protein map of early larvae of common carrion-breeding flies were obtained using 2-DE in the range of pH 4-7. After silver stained detection of spots, we find that there are marked difference among these maps. Isoelectric points and molecular weight analysis indicated that 2DE map be beneficial to identification early larvae of common carrion-breeding flies which are confused in morphology.

3. Detection of food source by PCR analysis of the gut contents of *Aldrichina grahami* (Aldrich) (Diptera: Calliphoridae) During Post-feeding Period.

Maggot last meal may be useful in identifying host species. The DNA profile of host species was detectable in the "last meal". In this paper, mitochondrial DNA analysis of gut contents to identify the host of *Aldrichina grahami* (Aldrich) (Diptera: Calliphoridae) feeding on during post-feeding period. A modified logistic equations was fitted as the form: $y = \exp(a+b*x)/(1+\exp(a+b*x))$ to estimate the probability of detectable under five constant

temperatures (16, 20, 24, 28 and 32°C). Our results shows that detected time ranged from a maximum of 24 h at 32°C to 42 h at 16°C and a minimum of 12h at 32°C to 30h at 16°C. Furthermore, the food detectable time was also calculated to give the maximal time after larva hatching from egg. These results indicate that, in criminal cases where the maggots away from the corpse, “last meal” should not be overlooked as potentially critical evidence.

4. Biochemical character of four species of necrophagous flies during the development of larvae and pupae.

Under 24°C, the four species of flies arrived their maximum body weight for about 3 days after hatched from eggs, after that, the body weight decreased as Daily age increased. A modified logistic equations was fitted as the form: $y = \exp(a+b*x)/(1+\exp(c+d*x))$ to estimate the relationship between the body weight and larval age. The weight of flies pupa decreased not obviously, and the linear equations were fitted the relationship between the body weight and the pupa age.

Under 24°C, the four species of flies arrived their maximum protein content for about 3 days after hatched from eggs, after that, they changed slightly and the protein content decreased as Daily age increased. A modified logistic equations was fitted as the form: $y = \exp(a+b*x)/(1+\exp(c+d*x))$ to estimate the relationship between the protein content and larval age. The protein content of flies pupa decreased not obviously, and the linear equations were fitted the relationship between the protein content and the pupa age.

Under 24°C, the four species of flies arrived their maximum carbohydrate content for about 4 days after hatched from eggs and after that they changed slightly. A modified logistic equations was fitted as the form: $y = \exp(a+b*x)/(1+\exp(c+d*x))$ to estimate the relationship between the carbohydrate content and larval age. The carbohydrate content of flies pupa decreased gradually, and the linear equations were fitted the relationship between the carbohydrate content and the pupa age.

Under 24°C, the four species of flies arrived their maximum fucose content on different days after hatched from eggs, then the fucose content decreased as Daily age increased. A modified logistic equations was fitted as the form: $y = \exp(a+b*x)/(1+\exp(c+d*x))$ to estimate the relationship between the fucose content and larval age. The fucose content of flies pupa decreased

gradually, and the linear equations were fitted the relationship between the fucose content and the pupa age.

Under 24°C, the four species of flies arrived their maximum lipid content for about 4 days after hatched from eggs. A modified logistic equations was fitted as the form: $y = \exp(a+b*x)/(1+\exp(c+d*x))$ to estimate the relationship between the lipid content and larval age. The lipid content of flies pupa decreased gradually, and the linear equations were fitted the relationship between the lipid content and the pupa age.

5. Effect of temperatures on the biochemical character

Under five constant temperatures, larval body weight increased with increasing age. While they arrived at their maximum body weight, it was decrease slightly. But the time protracted as decreasing temperatures. A modified logistic equation was fitted as the form: $y = \exp(a+b*x)/(1+\exp(c+d*x))$ to estimate the relationship between the body weight and larval age under five constant temperatures. The body weight decreased obviously during the early pupae period, after that they decreased slightly during the pupae development stage except for the quick decrease in the end of the pupae stage. The linear equations were fitted the relationship between the body weight and the pupa age.

Under five constant temperatures, larval protein content increased with increasing age. While they arrived at their maximum value, it was decrease slightly. But the time protracted as decreasing temperatures. A modified logistic equation was fitted as the form: $y = \exp(a+b*x)/(1+\exp(c+d*x))$ to estimate the relationship between the protein content and larval age under five constant temperatures. The protein content decreased slightly during the whole pupae stage. The linear equations were fitted the relationship between the protein content and the pupa age.

Under five constant temperatures, larval carbohydrate content increased with increasing age. While they arrived at their maximum value, it was decrease slightly. Though the maximum values increased with the increasing temperatures, the time protracted as decreasing temperatures. A modified logistic equation was fitted as the form: $y = \exp(a+b*x)/(1+\exp(c+d*x))$ to estimate the relationship between the carbohydrate content and larval age under five constant temperatures. The carbohydrate content decreased slightly during during the early pupae period, after that they

decreased slightly during the pupae development stage except for the quick decrease in the end of the pupae stage. The linear equations were fitted the relationship between the carbohydrate content and the pupa age.

Under five constant temperatures, larval lipid content increased with increasing age. While they arrived at their maximum value, it was decrease slightly. But the time protracted as decreasing temperatures. A modified logistic equation was fitted as the form: $y = \exp(a+b*x)/(1+\exp(c+d*x))$ to estimate the relationship between the lipid content and larval age under five constant temperatures. The lipid content decreased slightly during the early pupae period, after that they decreased slightly during the pupae development stage except for the quick decrease in the end of the pupae stage. The linear equations were fitted the relationship between the lipid content and the pupa age.

6. Development profile of hemolymph soluble proteins during the larval and pupal stages in two species of necrophagous flies

The development profile of soluble hemolymph proteins was analyzed by the SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis during the larval and pupal stages of two species of necrophagous flies which was kept at 24°C. Several distinct component bands were resolved. The quantity of each protein band chaged with development in the larval and pupal stages acted a certain patter. The quantities of band a、c、A、F and P were differentiated during the larval third instar stage and the quantities of band a、c、A、F and G were differentiated during the pupae stage. Hemolymph proteins from early larvae after hatched from eggs showed distinct age-specific electrophoretic profiles.

7. Purification of storage protein of *Parasarcophaga crassipalpis* and antibody preparation

Storage protein of *Parasarcophaga crassipalpis* while Hymolymph were conducted with (NH₄)₂SO₄ precipitation, Hydrophobic Interaction Chromatography, Gel Filtration Chromatography, and ion exchange chromatography. After that, anti-storage protein rabbit serum was obtained after the purified storage protein injected. We also have purified the serum by purification kit.

8. Storage protein content in two species of flesh flies during their development of larvae and

pupae by ELISA and temperatures effected on

The result of ELISA detection shows: under five constant temperatures , the storage larval protein content increased obviously with increasing age and after arriving the maximum value of the storage protein content decreased with increasing age slightly. But the time they arrived the maximum value protracted as decreasing temperatures. A modified logistic equation was fitted as the form: $y = \exp(a+b*x)/(1+\exp(c+d*x))$ to estimate the relationship between the storage protein content and larval age under five constant temperatures. The lipid content increasing to their pupae maximum value in the early pupae period, after that they decreased slightly during the pupae development stage except for the quick decrease in the end of the pupae stage. The linear equations were fitted the relationship between the storage protein content and the pupa age.

Flies of *Parasarcophaga crassipalpis* were reared under natural temperatures environment. According to the storage protein content of the larvae and pupae, we estimated the Daily age. It was indicated that it was more suitable for estimate the Daily age of larvae than pupae.

9. Conclusion

Forensic entomology as a new cross-subject depend on advance of new technology to a great extent. At present, it was considered that how to use the character, including the morphological and biochemical characters, is the most important work. And more accurate method such as species identification with DNA chip and age determination with protein chip, will be applied in this area in the future.

Key words: *Parasarcophaga crassipalpis*, *Boettcherisca peregrine*, *Lucilia sericata*, *Aldrichina grahmi*, *Chrysomya megacephala*, *Musca domestica*, forensic entomology, molecular detection, mt DNA, CO II, two dimensional electrophoresis, proteomic, species identification, crop, storage protein, protein purify, antibody, ELISA, temperature, protein, sugar, fucose, lipid

参考文献

- 陈主初, 梁宋平 主编. 肿瘤蛋白质组学. 北京: 湖南科学技术出版社, 2002. 266.
- 范滋德 主编. 中国常见蝇类检索表, 第二版, 北京: 科学出版社, 1992. 992
- 胡萃 主编. 法医昆虫学. 重庆: 重庆出版社, 2000. 366.
- 冯慧 主编. 昆虫生物化学分析法. 北京: 农业出版社, 1989. 126.
- 李凯, 叶恭银, 胡萃. DNA 分析技术在法医昆虫学中的应用. 中国法医学杂志, 2003, 18(2): 121-123.
- 景涛. 丽蝇科 7 种早期幼虫的形态研究. 动物世界, 1985, 2(1): 39-45.
- 马玉堃, 胡萃. 杭州地区尸食性昆虫种类与生物学特性的初步研究. 浙江农业大学学报, 1997, 23(4): 375-380.
- 马玉堃, 胡萃, 闵建雄. 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, 2000, 43(4): 388-393.
- 马玉堃, 胡萃, 洪健等. 巨尾阿丽蝇幼虫表皮几丁质片层的透射电镜观察. 寄生虫与医学昆虫学报, 2001, 8(1): 41-45.
- 马玉堃, 胡萃. 温度对两种常见丽蝇幼虫体长变化的影响. 胡萃, 程家安 主编, 城市昆虫学研究进展, 浙江大学出版, 2001: 99-105.
- 马玉堃. 杭州地区尸食性昆虫研究及其在法医学上应用的探讨. 浙江大学博士学位论文, 1996.
- 王江峰. 若干尸食性蝇类形态学及生长发育规律用于死后间隔时间判断的基础研究. 浙江大学博士学位论文, 1999.
- 王荫长 主编. 昆虫生物化学. 北京: 中国农业出版社, 2001. 487.
- 叶恭银, 胡萃. 法医昆虫学发展新趋势. 胡萃, 程家安 主编, 城市昆虫学研究进展, 浙江大学出版, 2001: 92-98.
- 张文忠, 薛瑞德. 4 种麻蝇早期幼虫形态的扫描电镜观察. 四川动物, 1986, 5(2): 11-14.
- 赵斌, 张文忠. 蝇蛹呼吸角的研究. 昆虫学报, 1984, 27(4): 401-405.
- 朱家颖, 李凯, 叶恭银, 胡萃. 北美法医昆虫学会及其论文简介. 昆虫知识, 2005, 42(4): 463-467
- 朱光辉, 叶恭银, 胡萃. 巨尾阿丽蝇幼虫血淋巴可溶性蛋白组成的时间特征. 浙江大学学报(农业与生命科学), 2004, 30, 69-72.
- 朱光辉. 尸食性蝇类发育生物化学用于法医昆虫学的基础研究. 浙江大学博士学位论文, 2003.
- Acosta-Serrano A, Vassella E, Liniger M, Renggli C K, Brun R, Roditi I, Englund P T. Proc. Natl. Acad. Sci., The surface coat of procyclic *Trypanosoma brucei*: programmed expression and proteolytic cleavage of procyclin

- in the tsetse fly. 2001, 98: 1513~1518.
- Amedt J, Krettek R, Niess C, *et al.* Forensic entomology in Germany. *Forensic Sci Int*, 2000, 113: 309~314.
- Andersen S O. 2000. Studies on proteins in post-ecdysial nymphal cuticle of locust, *Locusta migratoria*, and cockroach, *Blaberus craniifer*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30: 569~577
- Anderson G S. The use of insects in death investigations: an analysis of forensic entomology cases in British Columbia over a five year period. *Canadian Society of Forensic Sciences Journal*. 1995, 28(4): 277~292.
- Anderson, R S, and Peck S B. The Insects and Arachnids of Canada: Part 13. The Carrion Beetles of Canada and Alaska. Coleoptera: Silphidae and Agyrtidae. Research Branch Agriculture Canada. 1985, 1778.
- Avila F W, Goff M L. Arthropod succession patterns onto burnt carrion in two contrasting habitats in the Hawaiian Islands. *J Forensic Sci*, 1998, 43(3): 581~586.
- Baggerman G, Cerstiaens A, De L A, *et al.* Peptidomics of the larval *Drosophila melanogaster* central nervous system. *J Biol Chem*, 2002, 277: 40368~40374
- Beintema J J, Stam W T, Hazes B and Smidt N P. Evolution of arthropod hemocyanins and insect storage proteins (Hexamerins). *Mol. Biol. Evol.* 1994. 11: 493 ~ 503.
- Benecke M. A brief history of forensic entomology. *Forensic Sci Int*, 2001, 120: 2~14.
- Benecke M. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophagous insects (Diptera, Coleoptera) in criminal forensic studies: validation and use in practice. *Forensic Sci Int*, 1998, 98: 157~163.
- Benecke M. Six forensic entomology cases: description and commentary. *J Forensic Sci*. 1998, 43(4): 797~805.
- Benes H, Edmondson R G, Fink P, Kejzlarova-Lepesant J, Lepesant A, Miles J P and Spivey D W. Adult expression of the *Drosophila* Lsp-2 gene. *Dev. Biol.* 1994, 142: 138~146
- Beyer J C, Enos W F, Stajic M. Drug identification through analysis of maggots. *J Forensic Sci*, 1980, 25: 411~412.
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti P G, Gianaza E, Gorg A, Westermeier R, Postel W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradient: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Meths*, 1982, 6: 317~339
- Bornemissza G F. An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. *Australian Journal of Zoology*, 1957, 5: 1~12.
- Bourel B L, Martin-Boyer L, Hedouin V, Revuelta E, Gosset D. Estimation of postmortem interval by arthropod study: the case of a corpse wrapped in a plastic bag. 47th Annual Meeting of the American Academy of Forensic Sciences, Seattle, 1994.
- Bourel B, Fleurisse L, Hedouin V, Cailliez J C, *et al.* Immunohistochemical contribution to the study of morphine

- metabolism in calliphoridae larvae and implication in forensic entomotoxicology. J Forensic Sci, 2001a, 46 (3): 596~599.
- Bourel B, Hedouin V, Martin B L, *et al.* Effects of morphine in decomposing bodies on the development of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). J Forensic Sci, 1999, 44: 354~358.
- Bourel B, Tournel G, Hedouin V, *et al.* Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. Forensic Sci Int, 2001b, 120: 127~131.
- Bourel B, Tournel G, Hedouin V, *et al.* Determination of drug levels in two species of necrophagous coleoptera reared on substrates containing morphine. J Forensic Sci, 2001c, 46(3): 600~603.
- Brow W V, Rose H A, Lacey M J. The cuticular hydrocarbons of the soil burrowing cockroach *Geoscapheus dilatatus* (Saussure) (Blattodea: Blaberidae: Geoscapheinae) indicate species dimorphism. Comp Biochem Physiol, 1997, 118(3): 549~562.
- Burmester T and Scheller K. Ecdysteroid-mediated uptake of arylphorin by larval fat bodies of *Calliphora vicina*. Involvement and developmental regulation of arylphorin binding proteins. Insect Biochem Mol Biol. 1995, 25: 799 ~ 806.
- Burmester T and Scheller K. Identification of binding proteins involved in the stage- specific uptake of arylphorin by the fat body cells of *Calliphora vicina*. Insect Biochem Mol Biol. 1992, 22: 211 ~ 220.
- Burmester T and Scheller K. Ligands and receptors: Common theme in insect storage protein transport. Naturwissenschaften. 1999, 86 (10) : 468 ~ 474.
- Burmester T. Evolutionary history and diversity of arthropod hemocyanins. Micron. 2004, 35: 121~122.
- Byrd J H, Butler J F. Effects of temperatures on *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) development. J Med Ent, 1997, 34(3): 353~358.
- Byrd J H, Butler J F. The Effects of Temperatures on *Sarcophaga haemorrhoidalis* (Diptera: Sarcophagidae) Development. J Med Ent, 1998, 35(5): 694~698.
- Byrd J H, Castner J L. Forensic Entomology: the utility of arthropods in legal investigation. CRC Press, Boca Raton, 2001, 341.
- Byrd, J H, Butler J F . Effects of temperatures on *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) development. J Med Ent, 1996, 33(6): 901~905.
- Byrne, A L, Camann M A, Cyr T L, *et al.* Forensic implications of biochemical differences among geographic populations of the black blow fly, *Phormia regina* (Meigen). J Forensic Sci, 1995, 40(3): 372~377.
- Cagney G, Emili A. Nat Biotechnol, De novo peptide sequencing and quantitative profiling of complex protein

- mixtures using mass-coded abundance tagging. 2002, 20: 200~206.
- Campobasso C P, Vella G D, Introna F. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic Sci Int*, 2001, 120:18~27.
- Campobasso, C.P., Linville, J.G., Wells, J.D., and Introna, F. Forensic genetic analysis of insect gut contents. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 2005,26, 161-165.
- Carvalho L M L, Linhares A X. Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in southeastern Brazil. *J Forensic Sci*, 2001, 46(3): 604~608.
- Catts E P, Goff M L. Forensic entomology in criminal investigations. *Annu Rev Entomol*, 1992, 37: 253~272.
- Catts E P, Haskell N H. *Entomology and Death: A procedural guide*. Joyce's Print Shop, Clemson, 1990. 180p.
- Centeno N, Maldonado M, Oliva A. Seasonal patterns of arthropods occurring on sheltered and unsheltered pig carcasses in Buenos Aires Province (Argentina). *Forensic Sci Int*, 2002, 126: 63~70.
- Chae K S, Lee I H, Shoi C S, Kim H R. Purification and characterization of chitin-binding proteins from the hemolymph of sweet potato hornworm, *Agrius convolvuli*. *Comp Biochem Physiol. B*, 1999, 124: 475~481.
- Chow-Shaffer E, Sina B, Hawley W A, *et al.* Laboratory and field evaluation of polymerase chain reaction-based forensic DNA profiling for use in identification of human blood meal sources of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, 2000, 37(4): 492~502.
- Chung S O , Kubo T and Natori S. Molecular cloning and sequencing of arylphorin-binding protein in protein granules of *Sarcophaga* fat body .*J. Biol Chem.*1995,270: 4624 ~ 4631.
- Cole R W, Woodruff R I J. Charge Dependent distribution of endogenous proteins within vitellogenic ovarian follicles of *Actias luna*. *Insect Physiol.*, 1997, 43: 275~287.
- Corpus L M, Choi H, Muthukrishnan S and Kramer K J. Sequences of two cDNAs and expression of the genes encoding methionine-rich storage proteins of *Manduca sexta* . *Insect Biochem.*1991,21:265~276.
- Coulson R M R, Curtis C F, Ready P D, *et al.* Amplification and analysis of human DNA present in mosquito blood meals. *Med Vet Entomol*, 1990, 4: 357.
- Dekort C A D and Koopmanschap A B. Isolation and characterization of a larval hemolymph protein in *Locusta migratoria*. *Arch Insect Biochem . Physiol.* 1987, 4: 191 ~ 203.
- Dekort C A D and Koopmanschap A B. Nucleotide and deduced amino acid sequence of a cDNA clone encoding diapause protein 1, an arylphorin-type storage hexamer of the Colorado potato beetle. *J Insect Physiol.* 1994, 40: 527 ~ 535.
- Delobel B, Rahbe Y, Nardon C, Guillaud J and Nardon P. Biochemical and cytological survey of tyrosine storage

- proteins in Coleoptera: Diversity of strategies. *Insect Biochem. Mol. Bilo.* 1992, 23: 355 ~ 365.
- Dillon L C, Anderson G S. Forensic entomology: A database for insect succession on carrion in Northern and Interior B.C. Technical Report TR-04-96 Canadian Police Research Centre, Ottawa, Ontario, 1996.
- Dillon, L C, Anderson G S. Forensic entomology: The use of insects in death investigations to determine elapsed time since death. Technical Report TR-05-95 Canadian Police Research Centre, Ottawa, Ontario, 1995.
- DiZinno, J A, Lord, W D, Collins-Morton, M B, Wilson, M R, and Goff, M L. Mitochondrial DNA sequencing of beetle larvae (Nitidulidae: Omosita) recovered from human bone. *Journal of Forensic Science*, 2002, 47, 1337~1339.
- Duhamel R and Kunkel J. Cockroach larval-specific protein, a tyrosine-rich serum protein. *J. Biol Chem.* 1983, 258: 1461 ~ 14465.
- Ericsson C, Petho Z, Mehlin H. An on-line two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis protein database of adult *Drosophila melanogaster*. *Electrophoresis*, 1997, 18: 484~490.
- Farkas R, *et al.* Uncoupling of sequential heteromorphic developmental programs. *Arch. Insect Biochem Physiol*, 1999, 40: 1~16
- Fenn J B, Mann M, Meng C K, Wong S F, Whitehouse C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 1989, 246: 64~71.
- Fujii T, Sakurai H, Izumi and Tomino S. Structure of the gene for the arylphorin-type storage protein SP-2 of *Bombyx mori*. *J Biol Chem.* 1989, 264: 11020 ~ 11025.
- Fujimoto K, Okino N, Kawabata S, Iwanaga S and Ohnishi E. Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenol oxidase. A1 of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1995, 92: 7769 ~ 7773.
- Gagliano C R, Avenaggiato L. The detection of toxic substances in entomological specimens. *International Journal of Legal Medicine.* 2001, 114: 197~202.
- Gaudry E, Myskowiak J B, Chauvet B, Pasquero T, Lefebvre F, Malignon Y. Activity of the forensic entomology department of the French Gendarmerie. *Foresic Sci Int*, 2001, 120: 68~71.
- Gauss C, Kalkum M, Lowe M, Lerbrach H, Klose J. Analysis of the mouse proteome. (I) Brain proteins: separation by two- dimensional electrophoresis and identification by mass spectrometry and genetic variation. *Electrophoresis*, 1999, 20: 575~600.
- Goddard J, Lago P K. Notes on blowfly (Diptera: Calliphoridae) succession on carrion in Northern Mississippi. *Journal of Entomological Sciences.* 1985, 20: 312~317.

- Goff M L, Brown W A, Hewadikaram K A, *et al.* Effects of heroin in decomposing tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on estimation of postmortem intervals using arthropod development patterns. J Forensic Sci, 1991, 36: 537~542.
- Goff M L, Brown W A, Omori A I, *et al.* Preliminary observations of the effect of amitriptyline in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on estimation of postmortem intervals. J Forensic Sci, 1993, 38:316~322.
- Goff M L, Brown W A, Omori A I, *et al.* Preliminary observations of the effect of phencyclidine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae). J Forensic Sci, 1994, 39: 123~128.
- Goff M L, Brown W A, Omori A I. Preliminary observations of the effect of methamphetamine in decomposing tissues on the development rate of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on estimations of postmortem intervals. J Forensic Sci, 1992, 867~872.
- Goff M L, Lord W D, Entomotoxicology: a new area for forensic investigation, Am. J. Forensic Med. Pathol. 1994a, 15: 51~57.
- Goff M L, Lord W D. Hanging out at the sixteenth hole: problems in estimation of postmortem interval using entomological techniques in cases of death by hanging. 46th American Academy of Forensic Sciences Annual Meeting, San Antonio, TX, 1995.
- Goff M L, Miller M L, Paulson J D, *et al.* Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and detection of the drug in postmortem blood, liver tissue, larvae and puparia. J Forensic Sci, 1997, 42: 276~280.
- Goff M L, Omori A I, Goodbrod J R. Effect of cocaine in tissues on the rate of development of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae). J Med Entomol, 1989, 26: 91~93.
- Goff, M L, Odom C B. Forensic entomology in the Hawaiian Islands: three case studies. Am J Forensic Med Pathol. 1987, 8: 45~50.
- Goff, M L. Problems in estimation of postmortem interval resulting from wrapping of the corpse: A case study from Hawaii. Journal Agricultural Entomology, 1992, 9(4): 237~243.
- Gokool S, Curtis CF, Smith DF, *et al.* Analysis of mosquitoes bloodmeals by DNA profiling. Med Vet Entomol, 1993, 7 (3): 208.
- Greenberg B, Szyska M L. Immature stages and biology of fifteen species of peruvian Calliphoridae (Diptera). Ann Ent Soc Am. 1984, 77: 488~517.

- Greenberg B, Tantawi T I. Different developmental strategies in two Boreal blowflies (Diptera: Calliphoridae). J Med Entomol, 1993, 30(2): 481.
- Greenberg, B. Flies as forensic indicators. J Med Ent, 1991, 28(5): 565~77.
- Greenberg, B. Forensic entomology: case studies. Bull Entomol Soc Am. 1985, 31(4): 25-28.
- Greenberg, B., and Charles, J.K.. Entomology and the Law: Flies as forensic indicators. Cambridge University Press, Cambridge. 2002, 306.
- Greenstone M H, Stuart M K and Haunerland N H. Using monoclonal antibodies for phylogenetic analysis : an example from the Heliiothinae (Lepidoptera: Noctuidae). Ann Amer Ent Soc. 1991, 84 : 457 ~ 464.
- Gunatilake K, Goff M L. Decteciong of organophosphate poisoing in a putrefying body by analyzing arthropod larvae. J Foresic Sci, 1989, 34: 714~716.
- Gygi S P, Rist B, Gerber S A, Turecek F, Gelb M H, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. Nat. Biotechnol., 1999, 17: 994~999.
- Haddow J D, Poulis B, Haines L R, *et al.* Identification of major soluble salivary gland proteins in teneral *Glossina morsitans morsitans*. Insect Biochem Mol Biol, 2002, 32: 1045~1053
- Haines L R, Haddow J ., Aksoy S, Gooding R H, Pearson T W. The major protein in the midgut of teneral *Glossina morsitans morsitans* is a molecular chaperone from the endosymbiotic bacterium *Wigglesworthia glossinidia*. Insect Biochem. Mol. Biol., 2002, 32: 1429~1438.
- Hall M, Scott T, Sugumaran M, Soderhall K and Law J H. Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme and molecular cloning. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1995, 92: 7764 ~ 7768.
- Han Y S, Chun J, Schwartz A, Nelson S, Paskewitz S M. Induction of mosquito hemolymph proteins in response to immune challenge and wounding. Dev. Comp. Immu., 1999, 23: 553~562.
- Haskell, N H, McShaffrey D G, Hawley D A, *et al.* Use of aquatic insects in determining submersion interval. J Forensic Sci, 1989, 34: 622~632.
- Haunerland N H and Bowers W S. A larval specific lipoprotein: Purification and characterization of a blue chromoprotein from *Heliothis zea*. Biochem Biophys Res Commun. 1986, 134: 580 ~ 586.
- Haunerland N H and Shirk P D. Regional and functional differentiation in the insect fat body. Annu Rev Entomol. 1994, 40: 121~145.
- Haunerland N H, Nair K K and Bowers W S. Fat body heterogeneity during development of *Heliothis zea*. Insect Biochem. 1990, 20: 829~837.

- Haunerland N H. Insect storage protein: Gene families and receptors. *Insect Biochem Mol Biol.* 1996, 26: 755~765
- Hedouin V, Bourel B, Becart A, *et al.* Determination of drug levels in larvae of *Protophormia terraenovae* and *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) reared on rabbit carcasses containing morphine. *J Forensic Sci.* 2001, 46: 12~14.
- Hedouin V, Bourel B, Martin B L, *et al.* Determination of drug levels in larve of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) reared on rabbit carcasses containing morphine. *J Forensic Sci.* 1999a, 44(2): 351~353.
- Hedouin V, Bourel B, Martin B L, *et al.* Morphine perfused rabbits: A tool for experiments in forensic entomology. *J Forensic Sci.* 1999b, 44: 347~350.
- Hobischak, N R and G S Anderson. Freshwater-related death investigations in British Columbia in 1995-1996. A review of coroners cases. *Canadian Society of Forensic Sciences Journal*, 1997, 32: 97~106.
- Introna F J, Altamura B M, Dell'Erba A, *et al.* Time since death definition by experimental reproduction of *Lucilia sericata* cycles in growth cabinet. *J Forensic Sci.* 1989, 34(2): 478~480.
- Introna F J, Gagliano C R, Vella G D. Opiate analysis on empty puparia — positive results. *Proceedings of XX Internatinal Congress of Entomology.* 1996: 755.
- Introna F J, LoDico C, Caplan Y H, *et al.* Opiate analysis of cadaveric blow fly larvae as an indicator of narcotic intoxication. *J Forensic Sci.* 1990, 35: 118~122.
- Introna F J, Suman T W, Smialek JE. Sarcosaprophagous fly activity in Maryland. *J Forensic Sci.* 1991, 36: 238~243.
- Introna F, Vella G D, *et al.* Human and insect mitochondrial DNA analysis from maggots. *J Forensic Sci.* 2001, 46 (3): 685~686.
- Introna F, Wells J D, Vella G D, *et al.* Human and other animal mtDNA analysis from maggots (abstract). *Proc Am Acad Foren Sci.* 1999, 5: 196.
- Introna, F J, Campobasso C P, and Di-Fazio A. Three case studies in forensic entomology from southern Italy. *J Forensic Sci.* 1998, 43(1): 210~214.
- Jakub Godlewski, Barbara Kludkiewicz, Krystyna Grzelak, Bronislaw Cymborowski. Expression of larval hemolymph proteins (Lhp) genes and protein synthesis in the fat body of greater wax moth (*Galleria mellonella*) larvae during diapause. *J Insect Physiology.* 2001, 47: 759~766.
- James M C. Stability of prostate specific antigen (PSA), and subsequent Y-STR typing, of *Lucilia*(Phaenicia) *sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) maggots reared from a simulated postmortem sexual assault.

- Forensic Sci Int, 2001, 120: 72~76.
- Jamroz R C, Beintema J J, Stam W T and Bradfield J Y. Aromatic hexamerin subunit from adult female cockroaches (*Blaberus discoidalis*): molecular cloning, suppression by juvenile hormone, and evolutionary perspective. *J Insect Physiol.* 1996, 42: 115 ~ 124.
- Jensen C, Andersen S. O, Roepstorff P. Primary structure of two major cuticular proteins from the migratory locust, *Locusta migratoria*, and their identification in polyacrylamide gels by mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1998, 1429: 151~162.
- Jiang, S, AGiuffra, E, Anderson, L, Xiong, Y. Molecular phylogenetics relationship between six Chinese native pig breed and three Swedish pig breeds from mitochondrial DNA, *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28, 1120~1128.
- Jones G, Brown N, Manczak M, Hiremeth S and Kafators F. Molecular cloning, regulation, and complete sequence of a hemocyanin-related juvenile hormone-suppressible protein from insect hemolymph. *J Biol Chem.* 1990, 265: 8596 ~8602.
- Jones G, Manczak M and Horn M. Hormonal regulation and properties of a new group of basic hemolymph protein expressed during insect metamorphosis. *J Biol Chem.* 1993, 268: 1284 ~ 1291.
- Jones G, Ryan R O, Haunerland N H and Law J H. Purification and characterization of a very high density chromolipoprotein from the hemolymph of *Trichoplusia ni*. *Arch. Insect Biochem Physiol.* 1988, 7: 1 ~ 11.
- Kaltenhauser U, Kellermann J, Andersson K. Purification and partial characterization of bursicon, a cuticle sclerotizing neuropeptide in insects, from *Tenebrio molitor*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1995, 25: 525~533.
- Kang Y B. Classification and identification of the blowfly *Lucilia sericata* and the flesh fly *Sarcophaga fushicauda* with particular reference to animal health in Korea. 1. Scanning electron microscopy on spiracles in larvae. *Korean J Vet Public Health*, 1988, 12: 211~216.
- Kanost M R, Kawooya J K, Law J H, Ryan R O, Van Heusden M C and Ziegler R. Insect hemolymph proteins. *Adv Insect Physiol.* 1990, 22: 299 ~ 396.
- Karas M., Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. *Anal. Chem.*, 1988, 60: 2299~2301.
- Kawabata T, Yasuhara Y, Ochiai M, Matsuura S and Ashida M. Molecular cloning of insect pro-phenol oxidase: a copper containing protein homologous to arthropod hemocyanin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1995, 92: 7774 ~ 7778.
- Keh B. Scope and applications of forensic entomology. *Annu Rev Entomol*, 1985, 30: 137~154.
- Kintz P, Tracqui A, Ludes B, Waller A, Boukhabza P, Mangin A, Lugnier A, and Chaumont A J. Fly larvae: a new

- toxicological method of investigation in forensic medicine. *J Forensic Sci*, 1990a 35: 204~207.
- Kintz P, Tracqui A, Ludes B, Waller A, Boukhabza P, Mangin A, Lugnier A, and Chaumont A J. Fly larvae and their relevance in forensic toxicology. *Am J Forensic Med Pathol*, 1990b, 11: 63~65.
- Kintz P, Tracqui A, Mangin P. Toxicology and fly larvae on a putrefied cadaver. *J Forensic Sci Soc*, 1990c, 30: 243~246.
- Kintz P, Tracqui A, Mangin P. Analysis of opiates in fly larvae sampled on a putrefied cadaver. *J Forensic Sci Soc*. 1994, 34: 95~97.
- Kreike J, Kampfer S. Isolation and characterization of human DNA from mosquitoes (Culicidae). *Int J Legal Med*, 1999, 112: 380.
- Kumaran A K, Memmel N A, Wang C, Trewitt P M and Kumaran A K. Developmental regulation of arylphorin gene activity in fat body cells and gonadal sheath cells of *Galleria mellonella*. *Insect Biochem Mol Biol*. 1993, 23: 145 ~ 151.
- Leclercq M. Entomologie et médecine légale: datation de la mort. Observation inédite. *Rev. Med. Lidge*. 1983, 38: 735~738.
- Link A J, Eng J, Schieltz D M, Carmack E, Mize G J, Morris D R, Garvik B M, Yates J R. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol*. 1999, 17: 676~682.
- Linville J G, Wells J D. Surface sterilization of maggot using bleach does not interfere with mitochondrial DNA analysis of crop contents. *J Forensic Sci*, 2002, 47(5): 1055~1059
- Linville, J.G., Hayes, J., and Wells, J.D. Mitochondrial DNA and STR analyses of maggot crop contents: effect of specimen preservation technique. *Journal of Forensic Science*, 2004, 49, 341~344.
- Liu D, Greenberg B. Immature stages of some flies of forensic importance. *Annals of the Entomological Society of America*. 1989, 82: 80~93.
- Locke M and Collins J. Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. *J Cell Biol*. 1968, 36: 453 ~ 483.
- Lord W D. Case histories of the use of insects in investigations. In *Entomology and Death: A procedural guide*. E P Catts and N H Haskell, Eds. Forensic entomology specialties. Clemson, SC, 1990, 9~37.
- Lord W D. Case histories of the use of insects in investigation, in: Catts E P, Haskell N H (Eds), *Entomology and death: A procedural guide*, Clemson, SC, Joyce's Print Shop, 1990, 9~37.
- Lord, W.D., DiZinno, J.A., Wilson, M.R., Budowle, B., Taplin, D., and Meinking, T.L. Isolation, amplification, and sequencing of human mitochondrial DNA obtained from human crab louse, *Phthirus pubis* (L.), blood meals.

- Journal of Forensic Science, 1998, 43, 1097~1100.
- Magee J, Kraynack N, Massey H C and Telfer W H. Properties and significance of a riboflavin-binding hexamerin in the hemolymph of *Hyalophora cecropia*. Arch.Insect Biochem Physiol. 1994, 25: 137 ~ 157.
- Malgorn Y, Coquoz R. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae: An interest in forensic entomology. Forensic Sci Int, 1999, 102: 111.
- Marchenko M I. Medicolegal relevance of cadaver entomofauna for the determination of the time of death. Forensic Sci Int, 2001, 120: 89~109.
- Maschat F, Dubertret M L, Thron P, Claverio J M and Lepesant J A. Structure of the ecdysone inducible P1 gene of *Drosophila melanogaster*. J Mol Biol. 1990, 214: 359 ~ 372.
- Megnin P. La faune de cadaveres: application de l'entomologie a la medecine lagale. Paris: Encycloedie scientifique des Aidememoires, 1894, 214p
- Mammel N A, Trewitt P M, Grzelak K, Rajaratnam V S and Kumaran K. Nucleotide sequence structure and developmental regulation of LHP82 a juvenile hormone-suppressible hexamerin gene from the waxmoth *Galleria mellonella*. Insect Biochem Mol Biol. 1994, 24: 133 ~ 144.
- Mammel N A, Trewitt P M, Silhacek D L and Kumaran A K. Nucleotide sequence and structure of the arylphorin gene from *Galleria mellonella*. Insect Biochem Mol Biol. 1992, 22: 333 ~ 342.
- Miller M L, Lord W D, Goff M L, *et al.* Isolation of amitriptyline and nortriptyline from fly puparia (Phoridae) and beetle exuviae (Dermestidae) associated with mummified human remains. J Forensic Sci, 1994, 39: 1305~1313.
- Miller S G and Silhacek D L. Binding of riboflavin to lipophorin and a hexameric protein in the hemolymph of *Heliothes virescens*. Insect Biochem Mol Biol. 1992, 22: 571 ~ 583.
- Miller S G, Leclerc R F, Seo S and Malone C. Synthesis and transport of storage proteins by testes in *Heliothis virescens*. Arch. Insect Biochem Physiol. 1990, 14: 151 ~ 170.
- Missios S., Davidson H. C., Linder D., Mortimer L., Okobi A. O., Doctor J. S. Characterization of cuticular proteins in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Insect Biochem. Mol. Biol., 2000, 30: 47~56.
- Mumcuoglu, K.Y., Gallili, N., Reshef, A., Brauner, P., and Grant, H. (2004) Use of human lice in forensic entomology. Journal of Medical Entomology, 41, 803~806.
- Munn E A and Greville G D . The soluble proteins of developing *Calliphora erythrocephala*, particularly calliphorin and similar protein in other insects. J Insect Physiol. 1969, 15: 1935 ~ 1950.
- Munn E A, Feinstein A and Greville G D. The isolation and properties of the protein calliphorin. Biochem J. 1971,

- Musvasva E, Williams K A, Muller W J, *et al.* Preliminary observations on the effects of hydrocortisone and sodium methohexital on development of *Sarcophaga (Curranca) tibialis* Macquart (Diptera: Sarcophagidae), and implications for estimating post mortem interval. Forensic Sci Int, 2001, 120: 37~41.
- Myers E and Miller W. Optimal Alignments in Linear Space. Cabios .1988, 4: 11 ~ 17.
- Myskowiak J B, Doums C. Effects of refrigeration on the biometry and development of *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae) and its consequences in estimating post-mortem interval in forensic investigations. Forensic Sci Int, 2002, 125: 254~261.
- Nakamatsu Y, Tanaka T. Development of a gregarious ectoparasitoid, *Euplectrus separatae* (Hymenoptera: Eulophidae), that parasitizes *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae). Arthropod Structure and Development, 2003, 32, 329 - 336.
- Naumann U and Scheller K. Complete cDNA and gene sequence of the developmentally regulated biosynthesis of arylphorin of *Calliphora vicina* and its relationship to insect hemolymph proteins and arthropod hemocyanins. Biochim Biophys Res Commun. 1991, 177: 963 ~ 972.
- Nelson R. W., Nedelkov D., Tubbs K. A. Biosensor chip mass spectrometry: a chip-based proteomics approach. Electrophoresis, 2000, 21: 1155~1163.
- Nestel D, Tolmashy D, Rabossi A, Quesada-Allue L. A. Lipid, carbohydrates and protein patterns during metamorphosis of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Physiology Biochemistry and Toxicology. 2003, 96: 237~244.
- Nestel D, Papadopoulos N T, Liedo P, Gonzales-Ceron L, Carey J R. Trends in lipid and protein contents during medfly aging: an harmonic path to death. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 2005, 60: 130~139.
- Nishida K, Shionaga S, Kano R. Growth tables of fly larvae for the estimation of postmortem intervals. Ochanomizu Medical Journal. 1986, 34: 9~24.
- Nolte K B, Pinder R D, Lord W D. Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body. J Forensic Sci, 1992, 37: 1179~1185.
- Nuorteva P. Studies on the significance of flies in the transmission of poliomyelitis III. The composition of the blow fly fauna and the activity of the flies in relation to the weather during the epidemic season of poliomyelitis in South Finland. Annales Entomologici Fennici. 1959, 25: 121~36.
- Nuorteva P., Nuorteva S. L. The fate of mercury in *Sarcosaprophagous* flies and in insects eating them. Ambio,

- 1982, 11: 34~37.
- Pan M and Telfer W H. Selectivity in storage hexamerin clearing demonstrated with hemolymph transfusions between *Hyalophora cecropis* and *Actias luna*. Arch Insect Biochem Physiol. 1992, 19: 203 ~ 221.
- Papura D., Jacquot E., Dedryver C. A., Luche S., Riault G., Bossis M., Rabilloud T. Two-dimensional electrophoresis of proteins discriminates aphid clones of *Sitobion avenae* differing in BYDV-PAV transmission. Arch Virol, 2002, 147: 1881~1898.
- Patrican L A, Vaidyanathan R. Arthropod succession in rats euthanized with carbon dioxide and sodium pentobarbital. Journal of the New York Entomological Society, 1995, 103: 197~207.
- Payne J A, King E W, Beinhart G. Arthropod succession and decomposition of buried pigs. Nature, 1968, 219: 1180~1181
- Payne J A, King E W. Insect succession and decomposition of pig carcasses in water. Journal of the Georgia Entomological Society, 1972, 73: 153~162.
- Payne J A. A Summer Carrion Study of the Baby Pig *Sus scrofa* Linnaeus. Ecology, 1965, 46: 592~602.
- Pennington S. R., Dunn M. J. 编著, 钱小红等译. 蛋白质组学: 从序列到功能. 北京: 科学出版社, 2002. 3.
- Pounder D J. Forensic entomotoxicology. J Forensic Sci Soc, 1991, 31:469~472.
- Rabilloud T, Vuillard L, Gilly C, *et al*. Silver-staining of protein in polyacrylamide gels: a general overview. Cell Mol Biol, 1994, 40: 57~75.
- Ray A, Memmel N A and Kumaran K. Developmental regulation of the larval hemolymph protein genes in *Galleria mellonella*. Roux Arch Dev Biol. 1987, 196: 414 ~ 420.
- Reed, H B. A Study of dog carcass communities in Tennessee, with special references to the insects. The American Midland Naturalist, 1958, 59: 213~245.
- Replogle, J., Lord, W.D., Budowle, B., Meinking, T.L., and Taplin, D. (1994) Identification of host DNA by amplified fragment length polymorphism analysis: preliminary analysis of human crab louse (Anoplura: Pediculidae) excreta, Journal of Medical Entomolog, 31, 686~690.
- Roberts D and Brock H. The major serum proteins of Dipteran larvae. Experientia. 1981, 37: 103 ~ 110.
- Rodriguez, W C, and W. M. Bass. Insect Activity and its Relationship to Decay Rates of Human Cadavers in East Tennessee. J Forensic Sci 1983, 28: 423~432.
- Ryan R O, Kfeim P, Wells M A and Law J H. Purification and properties of a predominately female-specific protein from the hemolymph of the larva of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. J Biol Chem. 1985, 260: 782 ~ 787.

- Sadler D W, Robertson L, Brown G. Barbiturate and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. J Forensic Sci, 1997, 42: 481-485.
- Sadler D W, Fuke C, Court F, Pounder D J. Drug accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. Forensic Sci Int, 1995, 71: 191-197.
- Sadler D W, Richardson J, Haigh S, *et al.* Amitriptyline accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. Am J Forensic Med Pathol, 1997, 18: 397-403.
- Schoenly, Goff K M L, Early M. A BASIC algorithm for calculating the postmortem interval from arthropod successional data. J Forensic Sci, 1992, 37(3): 808-823.
- Shipman B A, Ryan R O, Schmidt J O and Law J H. Purification and properties of a very high density lipoprotein from the hemolymph of the honeybee *Apis mellifera*. Biochem. 1987, 26: 1885 ~ 1889.
- Sihacek D L, Miller S G and Murphy C L. Purification and characteriatio of a flavin-binding storage protein from the hemolymph of *Galleria mellinella*. Arch Insect Biochem Physiol. 1994, 25: 55 ~ 72.
- Smith K G V. A manual of forensic entomology. London, Ithaca, British Museum of Natural History, Cornell Univ Press. 1986. 205p.
- Sohal R S, Lamb R E. Intracellular deposition of metals in the midgut of the adult housefly, *Musca domestica*. J Insect. Physiol, 1977, 23:1349-1354.
- Sohal R S, Lamb R E. Storage excretion of metallic cations in the adult housefly, *Musca domestica*. J Insect. Physiol. 1979, 25:119-124.
- Sperling F A H, Anderson G S, Hickey A D. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. J Forensic Sci, 1994, 39: 418.
- Stevens J, Wall R, Wells J D. Paraphyly in Hawaiian hybrid blowfly populations and the evolutionary history of anthropophilic species. Insect Molecular Biology, 2002, 11(2): 141-148.
- Stevens J, Wall R. Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. Forensic Sci Int, 2001, 120: 116.
- Stevens J, Wall R. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for studies of genetic variation in populations of the blowfly *Lucilia sericata* in Southern England. Bull Entomol Res, 1995, 85: 549.
- Telfer W H and Kunkel J G. The function and evolution of insect storage hexamers. Annu Rev Entomol. 1991, 36: 205 ~ 228.
- Tojo S, Betchaku T, Ziccardi V and Wyatt . Fat body protein granules and storage proteins in the silkworm

- Hyalophora cecropia*. J Cell Biol. 1978, 78: 8203~8238.
- Tojo S, Nagata M and Kobayshi M. Storage proteins in the silkworm *Bombyx mori*. Insect Biochem. 1980, 10: 289 ~ 303.
- Toyoshi Y, Kousei M, Sumio T .Developmental changes of storage proteins and biliverdin-binding proteins in the haemolymph and fat body of the common cutworm, *Spodoptera litura*. J Insect Physiol. 1998, 44: 67 ~ 76.
- Ueno K and Natori S. Possible involvement of lumichrome in the binding of storage protein to its receptor in *Sarcophaga peregrina*. J Biol Chem. 1987, 262: 12780 ~ 12784.
- Ueno K and Natori S. Identification of storage protein receptor and its precursor in the fat body membrane of *Sarcophaga peregrina*. J Biol Chem. 1984, 259: 12107 ~ 12111.
- Ueno K, Oshawa F and Natori S. Identification and activation of storage protein receptor of *Sarcophaga peregrina* fat body by 20-hydroxyecdysone. J Biol Chem. 1983, 258: 12210 ~ 12214.
- Uetz P., Giot L., Cagney G., Mansfield T. A., Judson R. S., Knight J. R., Lockshon D., Narayan V., Srinivasan M. Pochart P., Qureshi E, Li Y., Godwin B. Conover D., Kalbfleisch T., Vijayadamar G. Yang M. J., Johnston M. Fields S., Rothberg J. M. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature, 2000, 403: 623~627.
- Valenzuela J G. High-through put approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. Insect Biochem. Mol Biol, 2002, 32: 1199~1209
- Vance G M, Vandyk J K, Rowley W A. A device for sampling aquatic insects associated with carrion in water. J Forensic Sci, 1995, 40(3): 479~482.
- VanLaerhoven S L, Anderson G S. Forensic entomology. Determining time of death in buried homicide victims using insect succession. Technical Report TR 02-96, Canadian Police Research Centre, Ottawa, Ontario, 1996.
- VanLaerhoven S L, Anderson G S. Insect succession on buried carrion in two biogeoclimatic zones of British Columbia. J Forensic Sci, 1999, 44 :31~41.
- Vierstraete E, Cerstiaens A, Baggerman G, Bergh V G, Loof D A, Schoofs L. Proteomics in *Drosophila melanogaster*: first 2D database of larval hemolymph proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003, 304: 831~838.
- Vigoreaux J O. Genetics of the *Drosophila* flight muscle myofibril: a window into the biology of complex systems. Bioassays, 2001, 23: 1047~1063
- Vincent S, Vian J M, Carlotti M P. Partial sequencing of the cytochrome oxidase-b subunit gene I: A tool for the

- identification of European species of blow flies for postmortem interval estimation. *J Forensic Sci*, 2000, 45: 820.
- Wall R, French N, Morgan K L. Effects of temperatures on the development and abundance of the sheep blowfly *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae). *Bull Entomol Res*, 1992, 82 : 125.
- Wallman J F, Doconnellan S C. The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. *Forensic Sci Int*, 2001, 120: 60.
- Wang Z and Haunerland N H. Fate of differentiated fat body tissues during metamorphosis of *Helicoverpa zea*. *J Insect Physiol*. 1992, 38: 199 ~ 213.
- Wang Z and Haunerland N H. Receptor-mediated endocytosis of storage proteins by the fat body of *Helicoverpa zea*. *Cell Tissue Res*. 1994b, 278: 107~115.
- Wang Z and Haunerland N H. Storage protein uptake in *Helicoverpa zea*: Purification of the very high density lipoprotein receptor from perivisceral fat body. *J Bio Chem*. 1993, 268: 16673~16678.
- Wang Z and Haunerland N H. Storage protein uptake in *Helicoverpa zea* fat body. A single receptor mediates the uptake of arylphorin and VLDL. *Arch. Insect Biochem. Physiol*. 1994a, 26: 15 ~ 26.
- Wang Z and Haunerland N H. Ultrastructural study of storage protein granules in fat body of the corn earworm *Heliothis zea*. *J Insect Physiol*. 1991, 37: 353 ~ 363.
- Wasinger V. C., Cordwell S. J., Cerpa-Poljak A., Yan J. X., Gooley A. A., Wilkins M. R., Duncan M. W., Harris R., Williams K. L., Humphrey-Smith I. The proteome of *Mycoplasma genitalium* ... with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 1995, 16: 1090~1094.
- Webb B A and Riddiford L M. Synthesis of two storage proteins during larval development of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev. Biol*. 1988, 130: 677~668.
- Wells J D, Byrd J H, Tantawi T I. Key to third-instar *Chrysomyinae* (Diptera: Calliphoridae) from carrion in the Continental United States. *J Med Entomol*, 1999, 36(5): 638~641.
- Wells J D, Goff M L, Tomberlin J K. Molecular systematics of the endemic Hawaiian blowfly genus *Dyscritomyia grimshawi* (Diptera: Calliphoridae). *Med Entomol Zool*, 2002, 53(2): 231~238.
- Wells J D, Lamotte L R. Estimating maggot age from weight using inverse prediction. *J Forensic Sci*, 1995, 40(4): 585~590.
- Wells J D, Sperling F A H. DNA-based identification of forensically important *Chrysomyinae* (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int*, 2001, 120: 110~114.
- Wells J D, Sperling F A H. Molecular phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae).

- J Med Entomol, 1999, 36: 222~226.
- Wells J D, Introna F J, Vella G D, Campobasso C P, Hayes J, and Sperling F A H. Human and insect mitochondrial DNA analysis from maggots. J Forensic Sc., 2001, 46, 685~687.
- Wells, J.D. & LaMotte L R.. Estimating maggot age from weight using inverse prediction. Journal of Forensic Sciences. 1995, 40: 585-590.
- Wheeler D E and Martinez T. Storage proteins in ants (Hymenoptera: Formicidae). 1995, 112B: 15~19.
- Wheeler D E and Nuck N A. Protein, lipid and carbohydrate use during metamorphosis in the fire ant, *Solenopsis xyloni*. Physiological Entomology, 1992, 17: 397~403.
- Wheeler D E, Tuchinskaya I, Buck N A., Tabashnik B E. Hexameric storage proteins during metamorphosis and egg production in the diamondback moth, *Plutella xylostella*(Lepidoptera). J Insect Physiology. 2000, 46: 951 ~ 958.
- Williams H. A model of aging of fly larvae in forensic entomology. Forensic Sci Int, 1984, 25: 191~199.
- Willot E, Wang X Y and Wells M A. cDNA and gene sequence of *Manduca sexta* arylphorin, an aromatic amino acid-rich larval serum protein: homology to arthropod hemocyanins. J. Biol. Chem. 1989, 264: 19052~19059.
- Wilson Z, Hubbard S, Pounder D J. Drug analysis in fly larvae. Am J Forensic Med Pathol, 1993, 14: 118~120.
- Wohlenberg N, Lindsey T, Backer R, *et al.* Isolation of nortriptyline from maggots, muscle, hair, skin and cancellous vertebral bone in skeletonized remains. Proceedings of the 44th Annual Meeting of the American Academy of Forensic Sciences, 1992, 1 :199.
- Wolfe J, Akam M and Roberts D. Biochemical and immunological studies on llarval serum protein 1 the major haemolymph protein of *Drosophila melanogaster* third-instar larvae. Eur J Biochem. 1977, 79: 47 ~ 53.
- Xu C, Ding H, Ye G Y and Hu C. Dermining the postmortem interval using insect evidence. Forensic Science and Technology. 2004, 5. 38~40.
- Yan J X, Harry R A, Spibey C, Dunn M J. Postelectrophoresis staining of proteins by two-dimensional gel electrophoresis using SYPRO dyes. Electrophoresis, 2001, 21: 3657~3665.
- Zehner R, Amendt J, and Krettek R. STR typing of human DNA from fly larvae fed on decomposing bodies. Journal of Forensic Science, 2004, 49: 337~340.

附录 博士生期间发表和待发表文章

- [1] 蛋白质组学及其在昆虫学中的应用, 上海第三届江浙沪基因青年学术科技研讨会, 2003
- [2] DNA 分析技术在法医昆虫学中的应用, 中国法医学杂志, 2003, 18(2): 121-123
- [3] 第 22 届国际昆虫学大会法医昆虫学论文简介, 中国法医学杂志, 2005, 20(2): 126-128
- [4] 北美法医昆虫学年会及其论文简介, 昆虫知识, 2005, 42(4): 463-467
- [5] 丽蝇蛹集金小蜂寄生棕尾别麻蝇的生理学效应, 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2005, 31(1): 71-75
- [6] 双向凝胶电泳图谱用于常见尸食性蝇类初孵幼虫的鉴别, 昆虫学报, 2005, 48(4): 576-581
- [7] 棕尾别麻蝇金属硫蛋白的分离纯化及性质分析, 昆虫学报, 2006, 49(1): 22-28
- [8] 两种金小蜂体内 Wolbachia 的 wsp 基因的分子检测和序列分析, 植物保护学报 (接受)
- [9] Cuticular Hydrocarbon Composition in the Pupae Exuviae for Taxonomic Differentiation of Six Necrophagous Flies, Journal of Medical Entomology (接受, 修改中, SCI, IF=1.6)
- [10] Seasonal occurrence of forensically important flies in East China and their six common species identification by a DNA-based approach, (Submitted to Forensic Science International,)
- [11] Mitochondrial DNA analysis of gut content to identify the host of *Aldrichina grahami* (Aldrich) (Diptera: Calliphoridae) feeding on during post-feeding period, (Submitted to Insect Science)

致 谢

时空的距离感带来朦胧的美感,纯粹的回忆充满了梦想的诱惑。氤氲的华家池显然是滋生思想的好地方,青春肆扬的余温尚未散尽,毕业却已在即,无限感慨读博期间的往事!

本论文由胡萃和叶恭银两位教授悉心指导完成,我的成长凝聚着导师的心血,课题制定到论文写作过程是导师辛苦耕耘的过程,也是我聆听导师教诲的过程,他们严谨的治学精神将影响我的一生。二位师母在平时生活及思想上给予我很大帮助,在此特别向她们表示感谢!姚洪渭副教授在平时工作上给予的帮助,在此表示感谢!

在五年的学习研究过程中,本所何俊华教授、程家安教授、刘树生教授、陈学新教授、张传溪教授、施祖华教授、徐志宏教授、沈志成教授、祝增荣研究员、莫建初教授、唐启义研究员、姜永根教授、蒋明星教授、余虹副教授、马云副教授、姚洪渭副教授、刘银泉老师等在实验方面提供诸多便利,谢谢各位教师的帮助!

感谢浙江大学农业与生物技术学院研究生培养科袁熙贤老师、吴晓晶老师及马永芳老师在学习和生活上的关心与照顾!

浙江大学昆虫生理学实验室给我提供一个宽松、融洽、令人愉悦的生活和工作环境,实验过程得到已毕业师兄师姐的真诚帮助,并为课题提出诸多有益建议。吕慧平、刘志诚、朱光辉、蒋彩英、傅强等师兄(姐)毕业后还常牵挂本人课题的进展,实验过程中还得到已经毕业的三位师弟妹——王欢、朱家颖和郭建洋的帮助,本实验室张忠、陈茂、吴国星、黄诚华、姚鹏程、韦国栋、王慧、陈亮、卢新民、谭红、李芳芳、董胜张、石宇、高熹、吴玛莉、方琦、慎小晶、袁志东、张倩倩、董慧等师兄弟(妹)的帮助,本科生杨倩、刘银波、胡斌参与部分试验,余新友、叶恭堂、叶恭郎在实验准备及论文打印等方面给予帮助,在此向他们表示感谢!

在五年学习生活中还得到徐海君、林建国、尚金燕、杨章女等浙江大学应用昆虫学研究所分子生物学实验室所有同学的帮助,在此一并深表感谢。

感谢浙江大学环境工程研究所徐圣友博士、浙江省农科院张珏锋女士,博士生李金页、张潜、赵祥伟在学习和生活上给予了很多帮助。

弹指一挥间,五年的博士生生涯就将结束,至此论文完成之际,感谢我的父母和家人,他们的无私支持与帮助使我顺利完成学业。特别感谢我的妻子施海燕女士,正是因为她的理解、支持和鼓励使得我专心学业,让我在顺利完成学业的同时,拥有一个可爱的儿子和幸福的家庭,他们是我永远的精神支柱。

最后，谨向所有关心、支持和帮助我的领导、老师、同学和朋友们在此一并表示感谢，同时向参加论文评阅、评议及答辩委员会的专家、教授们致以诚挚的谢意。

李凯

2006 年 4 月于华家池畔