中国科学 C 辑:生命科学 2009 年 第 39 卷 第 4 期: 372 ~ 383
www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

论 文

家蚕荧光茧色的判性机理

张雨青, 虞晓华, 沈卫德, 马永雷, 周丽霞, 许乃霞, 尹书倩

苏州大学, 现代丝绸国家工程实验室, 基础医学与生物科学学院, 蚕丝生物技术实验室, 苏州 215123
E-mail: yqzhang@public1.sz.js.cn

收稿日期: 2008-10-05; 接受日期: 2009-01-23
国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA10A118)和国家现代农业产业技术体系资助项目

摘要 以家蚕荧光茧色判性品种为实验材料, 对蚕茧层表面和茧层抽提物的荧光光谱分析表明, 蚕茧荧光色不论雌雄都出现黄色和蓝紫色二个荧光发射峰, 因两者相对荧光强度不同而引起雌雄茧之间的荧光色差异. 通过对家蚕中肠组织的荧光观察和荧光显微观察, 发现蚕茧荧光色的雌雄差异或判性是由于雌蚕中肠组织对黄色荧光色素的特异性积累而引起的. 5 龄 4 日以后, 雌蚕食桑后经过中肠消化与吸收, 全部或大部分黄色荧光物质开始积累于中肠后部细胞内直至变态化蛹, 所有蓝紫色荧光物质单独或与少量黄色荧光物质一起分泌进入血液, 再到达丝腺体而使雌茧呈蓝紫或蓝白荧光色. 而雄蚕中肠组织对这二类荧光物质都不积累, 全部分泌进入血液再到达丝腺体最后使雄蚕茧呈黄白荧光色. 应用硅胶薄层色谱和荧光光谱分析提示, 蓝紫荧光色物质至少由 5 种蓝紫荧光色素成分组成, 而黄色荧光物质至少由 3 种黄色荧光色素成分组成; 从雄蚕茧层中提取到的黄色荧光色素与雌蚕后部中肠积累的色素完全相同. 紫外光谱分析和 $AlCl_3$ 显色反应表明, 3 种黄色荧光色素属于黄酮类或黄酮苷类化合物, 其中一种黄色荧光色素(Rf=0.82)为主要成分, 其荧光发射光谱最大发射峰为 533 nm, 激发光谱峰值为 377 nm. 上述结果充分表明, 家蚕荧光判性品种的雌雄荧光茧色差异就是由雌性家蚕中肠尤其是后部中肠对黄色荧光色素的特异性积累而引起的. 因此, 可以推测, 在荧光茧色判性的 5 龄雌蚕中肠, 特别是后部中肠上皮圆筒形细胞中特异表达一种能与黄色荧光色素结合的蛋白.

关键词
家蚕
荧光茧色
判性
色素
中肠
积累

家蚕(*Bombyx mori*)茧层在紫外线照射下呈现多种荧光色, 通常可以分为深浅不同的黄白和蓝紫系列两大类. 早在 20 世纪 20 年代末, 日本学者就发现了这一现象, 通过遗传学分析[1~4], 发现茧色的荧光与缫丝解舒有非常密切关系, 黄荧光色茧解舒好而紫荧光色茧解舒差, 并认为茧荧光色是可以遗传的, 品种之间有差异. 因此, 人们想通过育种方法获得黄荧光色茧的新蚕品种, 以此来提高蚕茧的解舒特性.

另一方面, 人们早就知道雌雄蚕茧茧丝质和力学性能存在明显差异, 雄蚕茧丝纤度细, 经济性状好, 其缫制的生丝高于雌蚕茧 1~2 个等级, 可以显著地提高蚕业经济效益和开发蚕丝织物的新产品. 现行蚕茧在烘茧、煮茧、缫丝时都是雌雄混合加工, 只能缫制雌雄复合丝, 很难批量生产出 6A 级高品位生丝. 所以, 人们想方设法生产单一雄蚕茧, 如通过培育家蚕限性品种、性连锁平衡致死系统以及利用温敏致死性状等多种技术或方法饲养单一雄蚕, 但因种种原因这些技术大多在生产上还没有得到广泛的推广与应用[5].

20 世纪 70 年代起, 国内学者就开始将家蚕茧

引用格式: 张雨青, 虞晓华, 沈卫德, 等. 家蚕荧光茧色的判性机理. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39(4): 372—383

荧光色与性别联系在一起加以研究. 唐维六等人[6]曾从中国系统品种东 34 中分离出荧光茧色判性品种. 刘敬全等人[7]运用系统分离和杂交育种等手段也育成一对在紫外光下雌茧呈白色而雄茧呈黄色荧光的判性蚕品种——荧光×春玉. 虞晓华等人[8]通过改良现行品种育成了荧光色茧判性新品种——荧苏、荧晓以及苏·雄×荧晓等, 它们在紫外光照射下雄茧和雌茧分别呈黄白和蓝紫系列荧光色. 这些品种不仅保持现行蚕品种的优良经济性能, 雌雄蚕茧荧光判性率达到 99.98%, 完全可以雌、雄蚕茧分开缫丝, 生产出 6A 级高品质雄蚕丝, 而且雌蚕茧生丝品质也同时提高. 这项技术具有广阔的国内外市场、巨大的经济效益和社会效益[9~11]. 该技术 2006 年已获得国家发明专利授权[12], 同时获得农业部(2006GB2C100092)和江苏省重大成果转化基金资助(BA2006057), 现正在江苏省盐城市和南通市两个主要蚕业生产区推广应用.

对家蚕茧荧光色差异及其判性机理的探讨非常必要, 这关系到今后荧光茧色判性新品种的深入研究与开发的进程与方向. 尽管这方面的报道较多, 但大多数集中在调查、观察和比较血液、丝腺体和茧层中荧光物质种类和荧光色的异同. 有研究表明, 家蚕 3, 4 龄盛食期后蚕血液才出现黄荧光色, 到 5 龄第 4 日后绢丝腺才出现黄荧光色[13,14]. 大都认为家蚕茧的荧光色素来源于家蚕血液, 并与血液荧光色保持一致. 但也发现血液为黄荧光色, 而蚕茧却为紫荧光色[15]. 雌雄茧荧光色的不同是由于雌雄熟蚕血液的荧光色不同造成的, 绢丝腺对荧光色素没有选择吸收功 能[16]. 蚕老熟之前血液的荧光色变化较少, 且雌雄血液的荧光色差异也不显著, 随蚕的老熟, 荧光判性蚕雌雄间荧光色素出现显著差异[17]. 造成上述结果有多方面的原因, 其中主要是由实验用蚕品种不同、血液取样时间不同以及对黄荧光色和紫荧光色本质的认识差异等因素引起的.

像上述血液、丝腺与蚕茧荧光色的关系一样, 有关荧光色素种类与特性方面的研究结果也因所用蚕品种不同或研究方法不同而有明显差异. 纸层析得出竹色茧 “正白× B8 斑油”茧层有 7 种色素, 绿茧“大造”茧层荧光色素有 9 种[18], 其中 5 种为黄酮类色素, 4 种为黄酮类色素类似物[19]. 而应用薄层色谱结合紫外扫描、高效液相色谱和纸层析的结果表明, 家蚕茧层中含有多种荧光色素, 雌雄间其色素种类大致相同, 因相对含量不同而引起荧光茧色的差异[20]. 多数研究[21~23]表明, 黄色荧光色素极性大、亲水性强, 而蓝紫色荧光色素相对极性低, 这大概就是黄荧光茧层的解舒优于紫荧光茧的原因. 有研究[24, 25]认为, 茧层提出物的紫外吸收峰基本相同(λ_{max}=270 nm, λ_{max}=240 nm), 是黄酮类色素和黄酮类色素类似物. 质谱分析推定荧光色素为分子量为 340 的黄酮醇类化合物, 各色素分子结构极相似.

到目前为止, 荧光判性雌雄蚕茧为什么会呈现不同的荧光色及荧光色素究竟有哪几类、哪几种仍不清楚. 本文通过对家蚕茧层表面直接荧光光谱分析、家蚕组织荧光显微观察以及中肠组织、茧层和茧层抽提物的薄层色谱、荧光光谱和紫外光谱分析, 探讨蚕茧荧光茧色判性蚕品种雌雄间不同荧光色的成因, 为今后更多种荧光茧色判性新品种的研究与开发, 以及荧光色素的基因调控等提供重要的科学依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

家蚕荧光判性品种为荧苏×荧晓[26], 2006 年 6 月饲养. 荧苏是中国系统二化性四眠荧光茧色判性蚕品种, 其雄茧为黄荧光, 雌茧为紫荧光, 判性达 100%. 荧晓为日本系统二化性四眠荧光茧色判性蚕品种, 茧同样具有荧光判性, 雄茧为黄荧光, 雌茧为紫荧光, 判性 99.8%[27]. 荧苏×荧晓雌茧在紫外光照射下发射蓝紫色或蓝白色荧光, 雄茧发黄色或黄白色荧光.

1.2 荧光物抽提

取一定量的剪碎的茧壳或茧衣、中肠组织或者是从一维或二维硅胶板上用刀刮下的层析斑, 分别浸入 100%甲醇溶液中在 50℃振摇抽提 1~2 天, 用离心或过滤方法取出上清液, 在旋转浓缩蒸发仪上浓缩, 最后将制备好的荧光物质抽提液置于 4℃备用.

1.3 二维薄层色谱

硅胶薄层层析一维展开液按石油醚：乙酸乙酯：

三氯甲烷＝8∶3∶2 比例配制, 薄层层析用硅胶板由烟台化学工业研究所生产, 规格为 HSGF254(200×100 mm). 而二维展开液按正丁醇∶冰醋酸∶水=4∶1∶2 比例配制, 置于分液漏斗中充分混合平衡后, 取上层液备用; 将试样约 10 μL 点滴于薄层硅胶板上, 在室温条件下一维展开后风干, 再进行二维展开, 在 365 nm 紫外线下确认一维或二维展开的色斑位置, 计算 *Rf* 值.

1.4 荧光光谱和紫外光谱分析

茧层表面或冻干的中肠组织表面进行直接荧光光谱分析时, 应先将其剪成 1.5 cm×1.5 cm 左右茧片或适当大小的中肠肠壁, 弧形面以 45°朝光源入射方向和反射方向的荧光分光光度计(日立 F-4500 型)样品架内, 测定各茧壳或中肠组织表面的直接荧光光谱. 在各种样品抽提液的荧光激发光谱和荧光发射光谱分析时, 先将提取液滴于滤纸上置于 50℃烘干, 再测定滤纸吸附物的荧光光谱, 而茧壳外表面或中肠组织表面置于比色架内直接测定荧光光谱. 通常情况下荧光光谱分析的条件(除特别说明外)如下: 激发波长 360 nm, 发射波长 530 nm(用于黄色荧光物质)或 430 nm(用于蓝紫色荧光物质); 电压: 950 V, 激发狭缝: 2.5 nm, 发射狭缝: 1.0 nm.

各种样品抽提液的紫外光谱分析在日立 U-3000 型紫外-可见分光光度计上进行, 其空白对照液为其抽提的溶剂.

1.5 三氯化铝显色反应

用 95%乙醇溶液配制 2% $AlCl_3$ 溶液, 并喷雾于硅胶层析色斑上, 用电吹风吹干后, 紫外线下观察其显色反应情况.

2 结果与分析

2.1 荧光判性蚕茧的荧光色

荧光判性蚕茧在日光下与普通蚕茧相同, 都呈白色(图 1(A)), 但在黑暗环境中经紫外光线照射, 雌性蚕茧呈蓝色荧光(图 1(B)左图), 而雄性呈黄白色荧光(图 1 (B)右图). 普通蚕茧在紫外光下也会呈现不同的荧光茧色, 但没有判性特征. 应用荧光倒置显微镜(Nikon TE2000U)观察茧壳表面, 发现雌蚕茧表面纤维呈深蓝紫色(图 1(C)左图), 而雄茧表面呈黄白色, 但其纤维几乎都呈蓝紫色, 原因是丝纤维表面的丝胶蛋白本身在紫外光下呈较弱的蓝色荧光(图 1(C)右图). 从雌、雄蚕茧的荧光判性分析, 培育的荧光判性新品种应该是荧光色越深、雌雄荧光色差异越大越易分辨, 但其还涉及到蚕茧经济性状及缫丝解舒特性等, 并不是判性蚕茧的荧光色越深越好. 本实验使用的荧苏×荧晓品种其经济性状与现行品种相似, 现正在较大范围内推广应用.

2.2 茧壳及其抽提物的荧光光谱分析

为了调查荧光判性蚕茧雌雄间荧光色的荧光光谱差异, 对茧壳外表面进行直接荧光光谱分析. 从图 2 中可以观察到雄茧壳的荧光发射光谱都出现两个发射谱带. 第 1 个较强的荧光发射带在 400~500 nm 范围内(或称紫色荧光谱带), 其峰值(λ_{1max})约在 440 nm, 峰不尖锐. 而第 2 个相对较小的发射谱带在 500~600 nm 范围内(或称黄色荧光带), 其发射峰值(λ_{2max})在 542 nm, 峰较尖锐. 后者与前者发射峰值强度比($\lambda_{2max}/\lambda_{1max}$)为 0.4(红直线); 当这些雄茧壳置于 50℃甲醇反复抽提, 获得的抽提液经旋转浓缩仪浓缩后滴于定性滤纸上, 风干后在同样条件下测定其荧光发射光谱, 结果如图 2 中红虚线所示. 可以发现其二条紫色和黄色的荧光谱带及其相对强度与茧层直接荧光光谱非常相似, 两个峰值处计算其$\lambda_{2max}/\lambda_{1max}$ 比值仍为 0.4, 表明应用茧层直接荧光光谱分析与甲醇抽提物的结果不仅基本一致, 且前者荧光强度明显强于后者. 由以上结果可见, 雄蚕茧呈现黄白荧光色主要是由λ_{2max} 荧光发射带的相对强度决定的. 图 2 中, 蓝色直线雌蚕茧层表面的直接荧光发射光谱与雄蚕茧也相似, 但紫色和黄色两条谱带的相对强度不同, 紫色谱带的峰值与黄色谱带的峰值$\lambda_{2max}/\lambda_{1max}$ 比值更小, 为 0.24; 用雌蚕茧层经甲醇抽提后获得的荧光发射光谱(蓝色虚线)的二谱带峰值也是如此, 说明雌蚕茧在紫外光下呈现的蓝紫色荧光是由于黄色荧光谱带很弱, 而紫色荧光谱带很强所致. 雄蚕茧在紫外光下呈现的黄白色荧光, 主要是由于黄色荧光谱带强度增强而引起. 所以, 无论是蚕茧的直接荧光光谱分析,

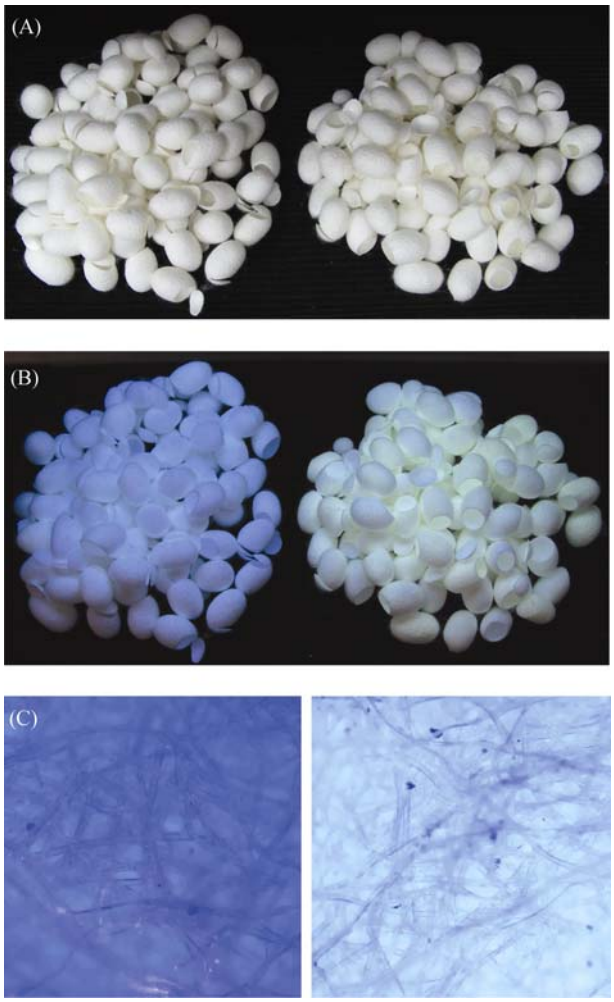

图 1 日光(A)和紫外光(B)照射下以及荧光倒置显微镜下(C)家蚕雌雄茧的荧光色观察

实验品种: 荧苏×荧晓; 左边为雌性蚕茧; 右边为雄性蚕茧. 在 Nikon TE2000 显微镜下观察 40× (UV)

还是甲醇抽提物的荧光光谱分析, 上述结果都表明蚕茧中黄色荧光发射谱带的强度决定了雌雄蚕茧之间荧光色差异程度. 同时, 也证明用茧壳进行直接荧光光谱分析是完全可以反应蚕茧层内荧光物质真实的荧光光谱信息的. 特别是通过两条发射谱带峰的比值, 就可以了解蚕茧荧光色及其差异. 这为今后荧光判性蚕茧新品种的研发及其荧光分析、分类等研究提供了一个快速、简便且较准确的方法.

2.3 家蚕、蚕茧、器官及组织的荧光显微观察

为调查荧光物质在雌雄蚕体内的分布, 首先对 5 龄熟前 1 天家蚕丝腺体、中肠组织进行了荧光观察, 结果发现在 365 nm 紫外光照射下, 雌蚕中肠组织发出很强的黄色荧光, 而且均是在中肠后部组织, 而其丝腺体则出现蓝紫荧光色, 与雌蚕茧的蓝紫色荧光相同(图 3(A)). 而那些雄蚕中肠组织就不存在黄色荧光物质, 其熟蚕丝腺体呈黄白色荧光, 基本与其蚕茧表面的荧光色相似(图 3(B)), 这充分说明雄蚕中肠组织不积累任何黄色荧光物质. 图 3(C)中可以清晰地判断黄色荧光物质几乎全部积累于雌蚕中肠后部、约占中肠组织约 2/5. 为此, 利用荧光倒置显微镜对中肠组织作了进一步荧光显微观察(图 4). 图 4(A)是将后部中肠壁放大 40 倍的荧光显微照片. 从中可以非常清晰地观察到, 中肠两旁的圆筒形细胞内充满黄白荧光物质. 在普通日光(图 4(B))和紫外光(图 4(C))照射下, 可以清楚地观察到中肠后部靠近中部的交接处黄色荧光物质的积累情况.

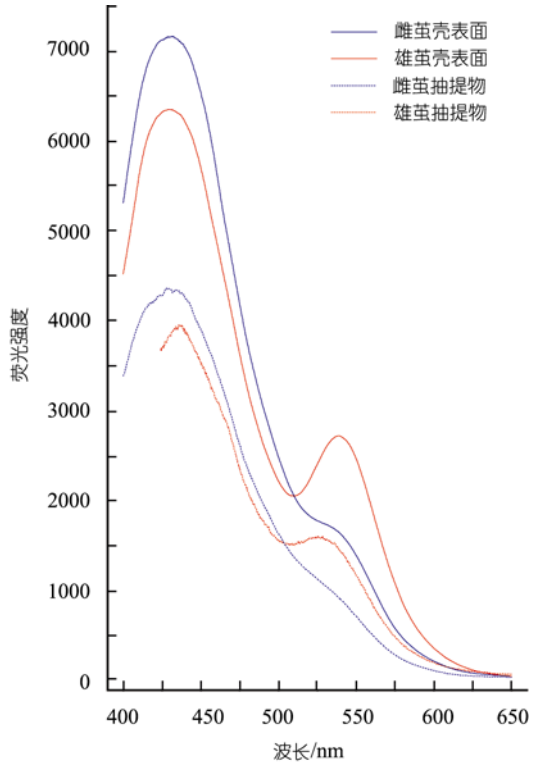

图 2 荧光判性蚕茧壳及其抽提物荧光发射光谱

蓝线和红线分别表示雌蚕和雄蚕茧壳及其甲醇抽提物; 直线和虚线分别表示蚕茧壳外表面和茧壳甲醇抽提物的荧光光谱; 荧光激发波长 360 nm

这一发现可以完全解释家蚕荧光判性品种荧光

色的雌雄之间差异. 荧光判性的雄蚕中肠对蓝紫色和黄色荧光物质都不积累, 全部分泌进入血液而到达丝腺体使蚕茧呈现这二类荧光物质的混合色——黄白色荧光茧系列, 其荧光色的深浅由这两类色素的含量与相对比例决定; 而雌蚕中肠将黄色荧光物质全部积累于后部中肠组织, 仅蓝紫色荧光物质分泌进入血液而到达丝腺体, 使雌蚕茧呈现蓝紫色荧光. 前面已提到, 在雌蚕茧层直接荧光光谱分析或者在其茧层抽提物中有些品种为什么会存在黄色荧光物质呢? 这可能是由于某些雌蚕中肠组织只有将大部分黄色荧光物质积累于后部组织, 而少量黄色荧光物质仍然与蓝紫色荧光物质一起进入血液后到达丝腺体, 从而使蚕茧呈浅色蓝白荧光.

同时对现在使用的普通家蚕品种(非荧光色判性的蚕品种)吐丝前 1 天的 5 龄熟蚕作了大量荧光观察, 发现有些蚕品种(如 7532)5 龄蚕中肠组织也含有黄色荧光物质, 但雌蚕和雄蚕中都有, 非雌性蚕中肠特异积累的. 所以, 这种黄色荧光物质在雌蚕中肠组织中的积累是人工培育后荧光判性蚕品种所特异的.

2.4 龄蚕血液与中肠荧光色

5 龄起蚕后, 对雌雄蚕血液和中肠组织的荧光色变化进行逐日观察. 用解剖剪刀割破 5 龄蚕后部腹足, 将蚕血滴在冰块保温的小塑料离心管中, 再分别吸出 10 μL 滴在定性滤纸上, 风干后在紫外光下观察. 结果表明 5 龄 1~3 日, 不论雌雄, 其蚕血液在 365 nm

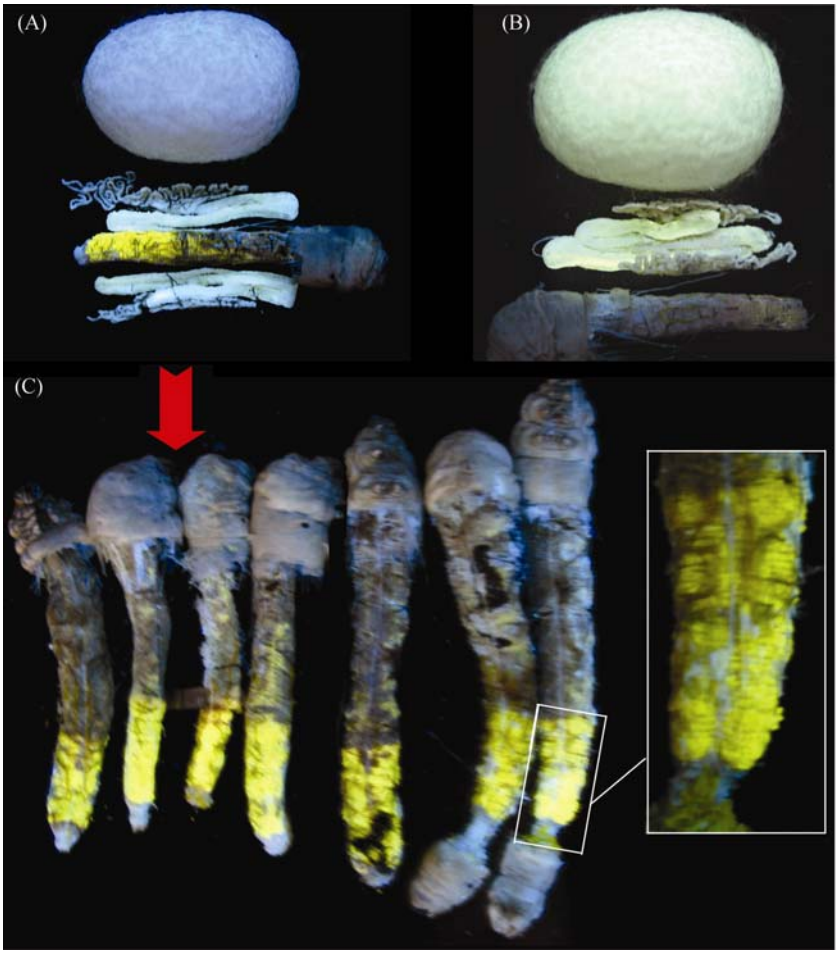

图 3 紫外光照射下的家蚕丝腺体、中肠及其荧光判性蚕茧

(A) 雌性; (B) 雄性; (C) 雌性后部中肠肠壁体视显微荧光观察(5×)

紫外光照射下的荧光色无明显差异, 即呈紫色, 而斑点中央部分较深, 似有黄色荧光物质存在(如同图 5(A)左边荧光斑点). 到第 4 日, 雌雄蚕血液荧光色出现明显的差异, 这种差异一直保持到吐丝前也没有发生任何变化. 在紫外光照射下, 塑料试管中吐丝前 1 天的雌蚕血液荧光色较暗(图 5(A)左下图), 而雄蚕血液发出很明亮的黄色荧光(图 5(A)右下图); 当将血液滴在纸上风干后, 其斑点四周无论雌蚕还是雄蚕

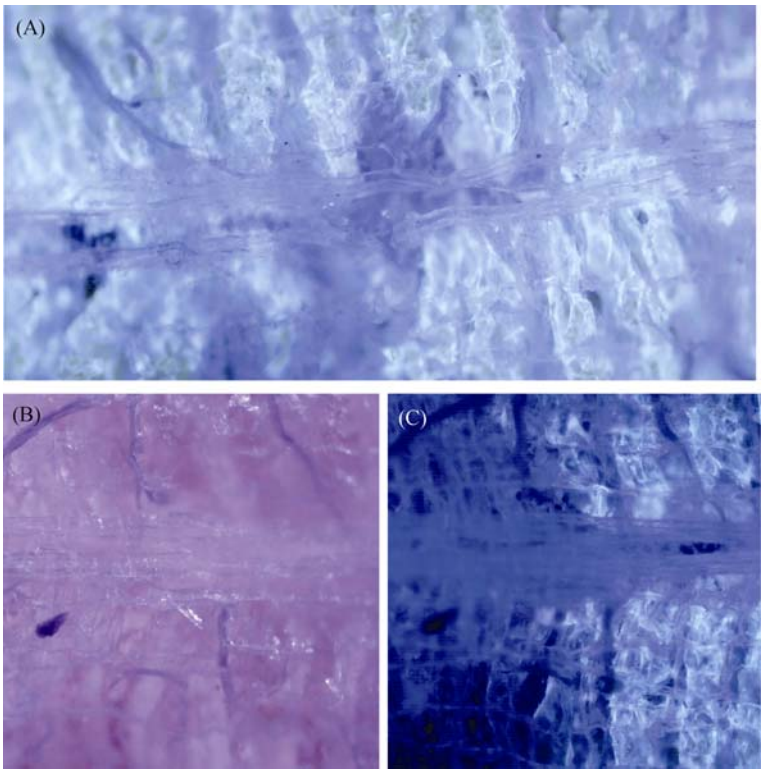

图 4　中肠组织荧光倒置显微观察

(A) 紫外光照射下的雌蚕中肠后部; (B)在可见光和紫外光下的中部与后部交接处肠壁; (C)在紫外光下的中部与后部交接处肠壁 (40×, Nikon TE2000U)

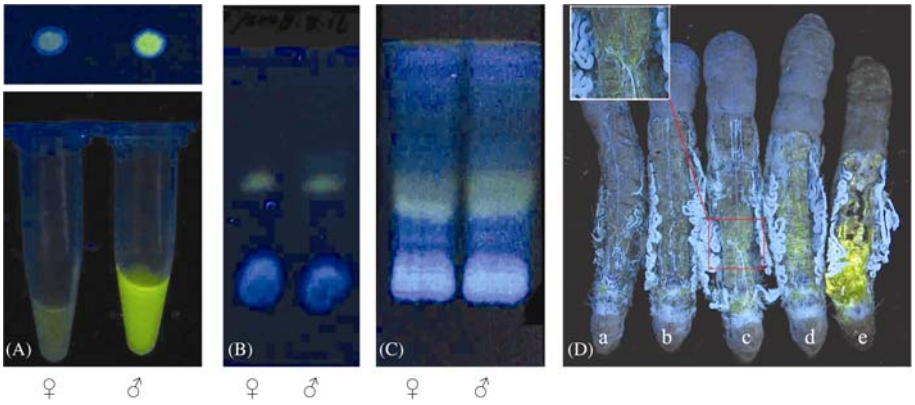

图 5　5 龄逐日后部中肠及血液的荧光色

(A) 紫外光照下 5 龄 6 日雌、雄蚕血液荧光色; (B) 血液直接硅胶层析图谱; (C) 冻干血液用甲醇抽提液硅胶层析图谱; (D) 紫外光下 5 龄后部中肠对黄色荧光色素逐日积累情况(a~e, 第 2~ 6 日)

都呈蓝紫色荧光, 但斑点中央的荧光色就呈明显差异, 雌蚕呈深紫色荧光斑, 好像是黄色荧光物质与紫色荧光物质的混合色; 而雄蚕血在斑点中央呈很亮的黄荧光和很淡的蓝紫荧光的混合色. 这一结果与于振诚等人[20]观察到的结果基本一致. 充分说明雌雄蚕血液的荧光色差异是从家蚕 5 龄盛食期开始的, 这也与以前报道的 5 龄第 4 日后绢丝腺才出现黄荧光色[20,17,18]一致. 当将雌雄蚕血液各 5 μL 直接滴于硅胶板上, 风干后用 2 号展开剂直接展开, 发现雌雄之间荧光色差异不明显(图 5(B), 左图为雌蚕血液, 右图为雄蚕血液). 在原位不移动的物质无论雌雄都呈蓝紫色荧光, 而出现的黄色荧光带无论雌雄, 其 *Rf* 都为 0.42, 其荧光强度差异不大, 没有滤纸上和试管中的血液在紫外光下观察到的差别那么明显, 而且蓝紫色荧光也没有展开, 这说明蚕血液中紫色荧光色素和某些黄色荧光色素含量很低, 很难在硅胶薄层色谱上直接分辨出来. 当将上述血液冻干后同样用甲醇溶液反复抽提, 其血液甲醇抽提液在与图 5B 相同条件下获得进行硅胶薄层色谱(图 5(C)), 可以观察到 2 条较明显的黄色荧光带靠得很近, 但第 2 条带的强度雌蚕血明显低于雄蚕血液; 而另一条黄色荧光带移动很快, 含量又很低、在雌雄冻干的蚕血液中要仔细观察才能发现.

图 5(D)所示在紫外光照射下雌性 5 龄蚕第 2, 3, 4, 5, 6 日的后部中肠组织的荧光照片. 第 2 天和第 3 天的中肠组织观察不到任何荧光色素的积累, 而到第 4 日发现中肠组织在 365 nm 紫光照射下出现黄色荧光(图 5(D)). 随后, 黄荧光色逐日增强, 到吐丝前(第 6 日)后部中肠黄色荧光快速积累, 发出强黄色荧光(图 5(D)). 这与前面所述的到 5 龄期第 4 日绢丝腺才出现黄荧光色的过程几乎是同步的. 对 5 龄雄蚕第 2, 3, 4, 5, 6 日的后部中肠组织作同样处理, 也观察不到有任何黄色荧光色素的积累情况. 这些结果充分说明, 5 龄蚕 1~3 日, 食桑量较小, 血液中紫色和黄色荧光色素雌雄间差异很小; 当第 4 日盛食后, 雄蚕的紫色和黄色荧光色素大量进入血液, 再到达丝腺体. 在雌蚕体内, 全部或大部分黄色荧光色素积累于中肠尤其是后部中肠, 仅全部紫荧光色素或其与少量黄色荧光色素一起进入血液, 再到达丝腺体.

2.5 中肠后部组织及其抽提物的荧光光谱

为了确定雌雄茧层甲醇抽提物中黄色荧光物质是否与雌蚕中肠后部积累的黄色荧光物质相同, 首先在解剖镜上将图 3 所示的后部中肠内容物和外部表皮、皮下脂肪等组织去除, 只剩下网状的中肠组织, 一部分用于直接荧光光谱分析; 而另一部分中肠组织和雄蚕茧层分别用甲醇溶液在 50℃抽提, 抽提液浓缩后再用甲醇溶解, 最后取中肠组织和雄蚕茧层抽提物上清液分别滴加在滤纸上, 干燥, 进行荧光光谱分析. 将上述 3 种样品的荧光光谱进行对比分析, 结果如图 6 所示. 雌蚕后部中肠组织直接进行测定的荧光发射光谱与其甲醇抽提物和雄蚕茧层甲 醇抽提物的发射光谱基本相同, 但其发射峰值向紫光方向依次偏移大约 5 nm, 它们分别是 542 nm, 538 nm 和 533 nm, 而它们的激发光谱谱带十分相似, 其激发光谱峰值都在 377 nm 或 378 nm 处. 这一结果也充分表明雌蚕中肠后部特异积累的黄色荧光物质与雄蚕茧层中存在的黄色荧光物质完全有可能是同类物质.

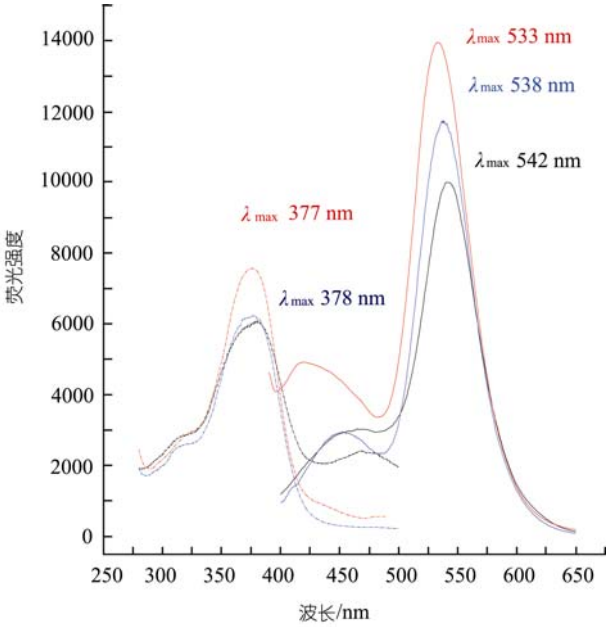

图 6 中肠后部组织及其抽提物和 Y-3 组分的荧光光谱比较
黑实线和黑虚线分别为后部中肠表面的荧光激发光谱与发射光谱; 蓝实线和蓝虚线分别为后部中肠抽提物的荧光激发光谱与发射光谱; 红实线和红黑虚线分别为雄蚕茧层抽提物 3 号 TLC 色斑的荧光激发光谱与发射光谱; 荧光发射光谱实验条件, 激发光谱: 360 nm; 荧光激发光谱的实验条件, 发射光谱: 542 nm, 530 nm(红虚线)

2.6　茧层和中肠提取物的薄层色谱

为了查明雌雄蚕茧中荧光物质的组成、种类及其雌雄间差异, 验证茧壳直接荧光光谱的分析结果, 利用二维薄层层析对雌雄茧荧光物质进行分离, 图 7 所示雌雄茧壳的甲醇抽提物, 在硅胶板上点样后使用 1 号展开剂先进行第一维薄层层析. 图 7(A)为雌茧抽提物点样后紫外光照射下蓝紫色斑, 当一维展开后, 可以非常清晰地观察到由 5 条色带组成. 上面 4 条呈深浅不同蓝紫色条带, 这 4 条色带分别称之为 B2, B3, B4 和 B5 色带, 其 *Rf* 值分别为 0.92, 0.69, 0.36 和 0.21, 其中 *Rf* 0.69 的 B4 色斑含量较低, 而其他 3 条含量较高; 仔细观察还发现 *Rf* 值为 0 的黄绿色斑在这种展开剂中没有移动, 中心与四周有明显差异, 未移动的蓝紫荧光色斑(称为 B1)可能与少量的黄色荧光物质重叠在一起, 从雄蚕茧抽提液的一维展开结果也可以证实这一点(图 7(B)). 点样后雄蚕茧抽提物在紫外光照射下呈黄绿色斑, 可以推测黄色荧光物质占主导, 经过一维展开后, 4 个蓝紫色荧光斑其位置与雌蚕完全相同, 只是某些条带含量不同而已, 未移动的原位斑则显得更亮, 这表明黄色荧光物质在 1 号展开剂中无法展开, 这也充分表明这种黄色荧光物质比 4 种蓝色荧光色素的极性强得多. 所以, 对 1 号色斑用水饱和正丁醇进行二维层析, 结果提示其还能分离成 3 个组分, 其中移动最快、含量最多的 3 号色斑(称为 Y3)*Rf* 值为 0.82, 紫外光照射下呈很亮的黄色荧光, 是黄色荧光物质的主要组分; 而移动速度较慢的 2 号色斑(称为 Y2, *Rf* 值 0.47)呈略带绿色的黄色荧光物质, 其含量较低, 是黄色荧光物质的次要成分; 移动比 Y2 色斑还慢的 Y1 色斑, 其 *Rf* 值为 0.41, 含量也较低. 这些条带移动和分离情况与中肠中提取到的黄色荧光色素组经二维用的展开剂展开后的结果完全一致(图 8). 当用 2% $AlCl_3$(95%乙醇溶解)溶液展开后样品板喷雾处理, 烘干后在紫外光下观察, 发现这 3 条黄色荧光色素带全变成蓝色, 这充分说明这 3 种黄色荧光色素是在 3, 5 邻位上有羟基的黄酮类化合物.

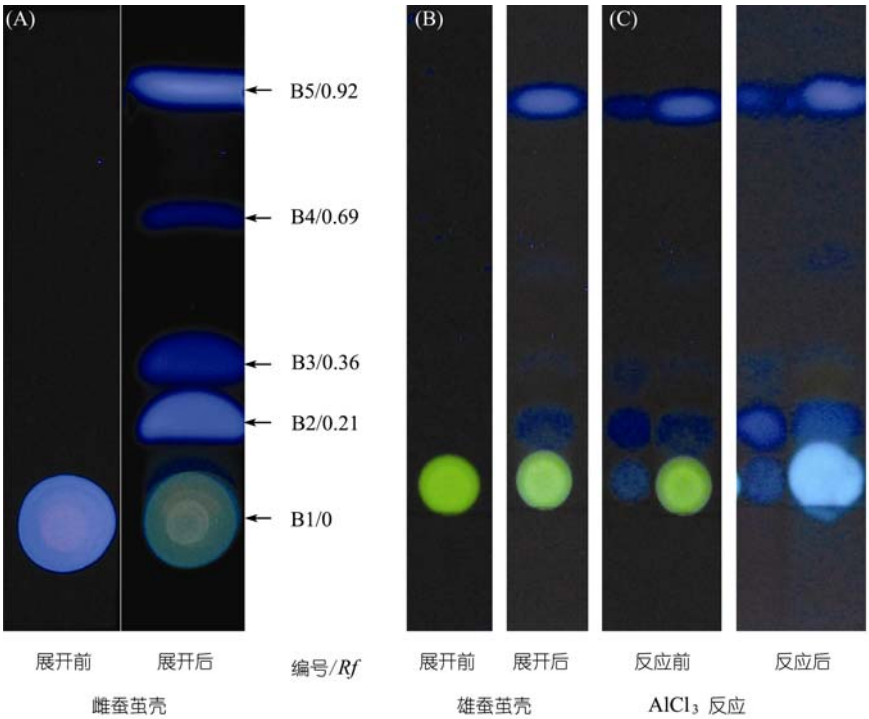

图 7　紫外光下雌雄蚕茧层甲醇抽提物的硅胶薄层色谱图

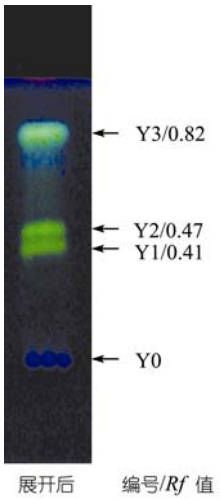

图 8　后部中肠甲醇抽提物的薄层色谱

2.7　荧光色素的荧光光谱

为了对荧光色素的各组分进行荧光光谱分析, 将第一次展开的 4 个色斑(B1~B5)和第 2 次展开后的 3 个色斑(Y1, Y2 和 Y3)分别从硅胶板上刮下, 再用同样的甲醇浸提, 其浸提液分别滴于滤纸干燥后直接上机分析. B1, B2, B3 和 B5 组分抽提物荧光光谱分析结果由图 9 所示. B1 属于蓝色荧光色素, 仅在 440.8 nm 附近出现发射峰; 组分 B2 和 B3 紫色荧光发射带与 B1 相似, 仅最大发射峰逐步向紫光方向移动, B2 和 B3 荧光发射峰分别为 420.2 和 392.6 nm, 不过它们的激发光谱基本相同, 最大激发光谱峰都在 330 nm 附近. B5 色斑在 400~500 nm 之间出现与前面 3 种色素相似的蓝紫色荧光发射带, 但出现了两个发射峰, 其位置分别与 B1 和 B2 的峰值相似, 在 420 和 440 nm 附近. 但其激发光谱与前 3 种色素明显不同, 最大激发光谱峰出现在 383 nm, 估计在分子结构上与前 3 种色素有较大差异. 而且, 此 B5 色素组分在第一次展开过程中, *Rf* 值最大为 0.92, 几乎与展开剂移动得一样快, 所以很有可能是二种分子类似的色素重叠在一起. 该组分经 EMS(–)质谱分析时证实, 确实是由分子量相差 5 的两个成分, 其分子量分别为 299.8 和 295.8(数据未显示). 实际上, 仔细观察 B1 在 420 nm 处也出现不很明显的肩峰, 同样 EMS(–)质谱分析表明它是两个组分的混合物, 其分子量分别为 406.3 和 422.3 的两种结构类似的色素, 后者比前者多一个羟基(数据未显示). 那么, B3 在 420 nm 处也出现肩

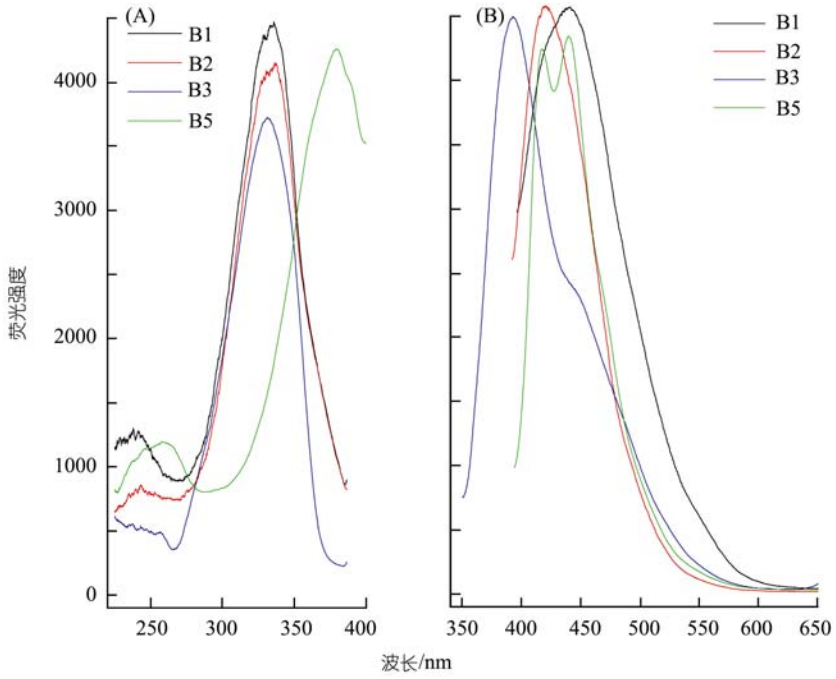

图 9　蚕茧层抽提物中紫蓝荧光物质(BP)主要组分的荧光光谱

(A) 激发光谱; (B) 发射光谱

峰, 同样有可能是两种组分混合在一起. 在本实验中加大了上样量而分离到 B4 的量仍很少(图 7(A)), 所以, 对这一组分没有进行相关的荧光光谱分析.

将二维展开的 3 种黄色荧光色素的荧光光谱进行了分析比较, 结果表明 Y1 和 Y2 荧光光谱与 Y3(图 6 中分别用红直线和红虚线表示的荧光发射光谱和荧光激发光谱)几乎相同, 仅不同的是 Y1 和 Y2 的荧光发射峰朝短波长方向略有位移, 比 Y3 峰值 533 nm 小 2~3 nm, 分别是 528 和 530 nm. 而它们 3 者的激发光谱几乎相同, 峰值都在 376 nm 左右. 经过 EMS(−)质谱分析表明, Y3 色斑含有两种成分, 其分子量分别为 465.5 和 494.5, 相差 29, 可能在结构上它们很相似(数据未显示).

以上结果表明, 家蚕荧光茧判性品种的蓝紫色荧光物质至少由 5 种色素组成, 主要由 B1, B2, B3 和 B5 4 种荧光色素组成. 荧光光谱分析表明 B1, B3 和 B5 出现肩峰, 但其中 B1 和 B5 的质谱分析揭示分别由 2 种分子量相近的色素组分组成. 所以, 家蚕荧光茧判性品种的蓝紫色荧光物质很可能是由 8 种色素组成. 而蚕茧的黄色荧光物质经硅胶层析表明, 是由 3 种黄色荧光色素组成, 但 Y3 色斑质谱分析同样表明也由 2 种分子结构相近的荧光色素组分组成, 所以, 黄色荧光色素至少由 4 种成分组成.

2.8 紫外吸收光谱

由这个 5 组分的紫外光谱(图 10(A))分析可知, B1, B2, B4 和 B5 在 II 带的 260~300 nm 之间都有较强的吸收带, 而在 I 带的 300~350 nm 都有吸收较强的肩峰, 但 B2 的 I 带明显朝长波长方向发生位移, 在 310~380 nm 有很强的吸收带. B3 在 II 带 260~300 nm 只有一较弱的吸收肩峰, 而在 I 带有很强的吸收带, 位于 300~350 nm. 但是, 这 5 种色素经 2% $AlCl_3$ 溶液(95% 乙醇溶液)喷雾处理后, 在紫外光下这些紫色荧光斑在荧光色上没有任何加深的现象. 所以, 这 5 种色素可能不属于黄酮类化合物及其衍生物.

Y1, Y2 和 Y3 在 245~300 nm 都有很强的吸收带(图 10(B)), 而在 300~380 nm 之间都有吸收较强的肩峰. 如上所述, 在硅胶板上分离的 3 个组分经 2% AlCl3 溶液喷雾处理后, 在紫外光下从原来的黄色转变成蓝色(图未列出), 说明在苯甲酰结构的 3, 5 位有邻二酚羟基存在. 从这些特征分析, 这 3 种色素可能属于黄酮醇类化合物.

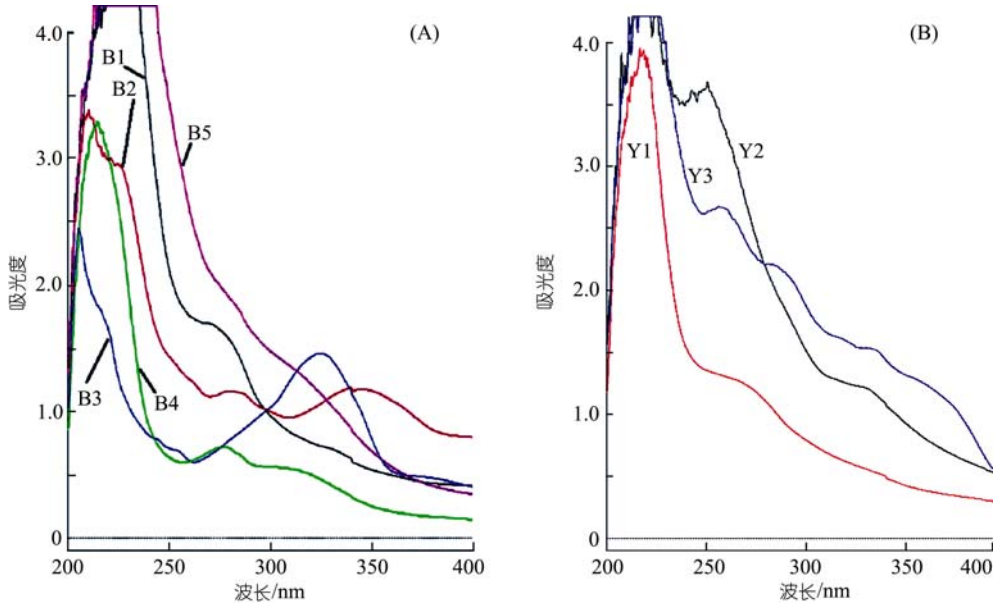

图 10　茧层抽提物二维展开后荧光色素的紫外吸收光谱

(A) 蓝紫荧光色素; (B) 黄色荧光色素

3 讨论

在本实验中, 首先采用了茧壳表面直接荧光光谱分析方法, 可大致了解荧光蚕茧壳表面的荧光光谱组成, 根据 400~500 nm 和 500~600 nm 两个波段发射峰的有无和高低可以鉴别出蚕茧的雌雄, 特别是根据 $\lambda_{max}542/\lambda_{max}440$ 比值, 可以确定雌、雄蚕茧荧光色的深浅和等级. 这项技术可能对家蚕荧光茧色的分类与分级具有参考价值. 同时还采用荧光物质甲醇或乙醇抽提液滴于滤纸, 待溶剂挥发、滤纸干燥后直接测定其荧光光谱, 这样就完全消除了溶剂对荧光物质可能产生的干扰. 该方法也可以应用到其他荧光物质的分析.

通过对冻干的家蚕五龄血液、器官和组织的荧光显微观察, 首次发现家蚕荧光茧品种中雌蚕中肠后部(约 1/3~2/5)积累全部或部分黄色荧光物质, 正是雌蚕中肠对荧光色素的差异吸收, 导致家蚕荧光茧色的判性. 以前认为中肠后端 1/3 部分的圆筒形细胞是上皮的主要组成部分, 这类细胞更为发达. 它有分泌和吸收的功能. 细胞核椭圆形或近圆形, 位于细胞的中部. 据电子显微镜观察, 细胞质内线粒体、糙面内质网和高尔基体均十分发达, 此外尚含有少量脂质小粒和液泡. 本实验发现中肠后部大量积累黄色荧光色素的部分正是这些圆筒形细胞部分. 这一发现使我们以前对荧光茧蚕血液、绢丝腺和茧丝荧光色之间的某些自相矛盾的结论或不一致的关系得到了合理的解释.

由结果可知, 在雌蚕后部中肠积累的黄色荧光物质, 从色谱行为和光谱特征等分析, 可以肯定它与雄蚕分泌到其茧层的黄色荧光物质是同一类色素. 充分说明家蚕幼虫特别是 5 龄盛食期大蚕食桑后, 在体内特别是中肠对桑叶中黄酮类物质的代谢是基本相同或相似的, 没有性别差异. 通过对冻干桑叶的紫外光观察, 发现有很少量的略带淡黄绿色的荧光物质存在, 这些物质可能是黄酮类及其衍生物. 但用同样方法获得的桑叶抽提物经色谱和光谱分析表明, 这些桑叶荧光物质特别是黄色荧光组分与家蚕中的完全不同, 且荧光很弱(数据未显示), 这充分表明桑叶中的黄酮类物质很可能以糖苷形成存在. 黄酮类物质大多有较强荧光, 当与单糖或寡糖结合后形成的糖苷往往会使荧光强度大大降低或消失; 另外, 以往很多研究也充分证实桑叶中确实存在许多黄酮苷类物质[28~32]. 据此可以推测, 通过幼虫咀嚼和中肠消化, 桑叶中黄酮苷类物质在糖苷酶水解作用下很可能切下部分与黄酮结合的单糖或寡糖, 使之发出较强的黄色或蓝色荧光. 这些能发出蓝色或黄色的荧光色素透过中肠进入血液, 再渗入丝腺体最后到达茧层. 从而就发出黄色与蓝色荧光的混合色——黄色或黄白色荧光. 那么, 为什么雌蚕不结上述这种黄色或黄白色荧光茧呢? 为什么它会结出蓝色或紫色荧光茧呢? 本实验色素抽提过程中还发现一个有趣的现象, 那就是无论从雄茧层还是从中肠中抽提到的黄色荧光物质黏在手指皮肤上以后, 用水反复冲去除不掉, 甚至用洗涤液也难以去除. 而紫色荧光抽提物是水溶性的, 不会吸附在手指表皮上. 由此推测雄蚕中肠特别是后部中肠上皮组织很可能存在一种类似于手指表皮组织的胶原蛋白, 这种蛋白能与全部或大部分黄色荧光色素牢固地结合. 这种蛋白是黄色荧光色素特异的, 很可能在荧光判性品种家蚕 5 龄中肠特别是后部中肠中大量表达. 因此, 雌蚕结出蓝紫色荧光色蚕茧是由于黄色荧光物质被吸附在中肠类似于胶原的一种蛋白上. 而雄蚕中肠内不存在这种特异表达的结合蛋白, 故可以结出二类荧光色素的混合色——黄色或黄白色荧光蚕茧.

目前, 本实验组正在对雌雄中肠之间的差异蛋白进行 2-D 电泳比较分析, 特别是研究后部中肠中能与黄色荧光色素结合的特异蛋白部分. 同时利用分子生物学手段, 对这种特异蛋白进行基因定位与表达. 通过这些后续研究, 有望在不远的将来可以完全解开家蚕茧荧光判性的分子机理.

参考文献

1 Oku M. The chemical studies on the pigments in the cocoon filaments of *Bombyx mori* (VⅡ). Nippon Nogeikagaku Kaishi (in Japanese) 1934, 10: 1014—1028

2 Oku M, Studies on cocoon pigment in the silkworm, *Bombyx mori*. (VⅢ) Quercetin glycosides in mulberry leaves. Nippon Nogei-

kaguku Kaishi (in Japanese), 1934, 10: 1029—1038
3 向仲怀, 黄先智, 夏庆友, 家蚕茧层荧光色的遗传分析. 蚕业科学, 1997, 23(2): 87—91
4 刘爱华, 陈克平, 姚勤, 家蚕荧光茧色分子标记初探. 安徽农业大学学报, 2005, 32(4): 490—492
5 虞晓华. 提供雄蚕茧的几种途径. 江苏蚕业, 2003, (2): 80—81
6 华南农学院蚕桑系. 限性蚕品种东 34 的选育. 广东蚕丝通讯, 1979, (1): 49—54
7 刘敬全, 于振诚, 崔玉梅, 等. 家蚕荧光茧色判性蚕品种荧光春玉的育成及其一代杂交种的选配. 蚕业科学, 1996, 22(2): 155—159
8 虞晓华, 贾仲伟, 尹书倩, 等. 家蚕新品种苏·雄×荧晓的选育. 蚕业科学, 2008, 34 (1): 140—143
9 虞晓华, 谢立群. 家蚕茧荧光色的遗传分析. 蚕业科学, 1997, 23(2): 147—151
10 向仲怀, 家蚕遗传育种学. 北京: 农业出版社, 1994. 129—226
11 虞晓华, 徐美华, 管竞芳, 等, 荧光技术在蚕品种选育中的应用, 江苏蚕业, 2001, 23(4): 8-10
12 虞晓华. 具荧光茧色判性的蚕品种的培育方法. 中国专利, 专利号: ZL3152829.5, 2006.1.25
13 藤本直正. 蚕绢丝腺的荧光色. 日本蚕糸学雑誌, 1950, 19(4): 323—328
14 于振诚, 刘敬全, 李道义, 等. 荧光茧色判性蚕品种荧光色素的初步研究. 蚕业科学, 1997, 23(1): 64
15 林昌麒, 姚琴, 陈克平, 等. 家蚕血淋巴与丝腺内液状丝物质及茧层荧光性研究. 蚕业科学, 1994, 20(1): 43—44
16 于振诚, 横山岳, 卷木里, 等. 限性蚕品种“荧光”的茧荧光色素的由来. 日本蚕糸学雑誌, 2001, 70(3): 159—161
17 于振诚, 顾寅钰, 张凤林, 等. 荧光茧色判性蚕品种雌雄幼虫荧光色素差异的研究. 蚕业科学, 2000, 26(2): 123—124
18 Fujimoto N, Kawakami K. Studies on the pigments of cocoon (Ⅱ) Genetical relationship between green cocoon and light green cocoon(Sasamayu) in the silkworm, *Bombyx mori*. J Seric Sci Jpn, 1958, 27(6): 391—392
19 林屋庆三, 杉本哲, 藤本直正. 关于茧色素的研究(Ⅲ)绿茧色素的定性. 日本蚕糸学雑誌, 1959, 28(1): 27—29
20 于振诚, 横山岳, 田村泰盛, 等.“荧光”蚕品种雌雄荧光色素的定性及相对量分析. 蚕业科学, 2002, 28(2): 151—156
21 陈克平, 林昌麒. 家蚕荧光茧色的研究——Ⅰ. 不同品种的荧光茧色. 蚕业科学, 1988, 2: 20—25
22 奥正已. 家蚕茧丝色素的化学研究(第十报)紫外线下茧的荧光色与茧丝色素的关系. 日本農芸化学会誌, 1934, 10: 1253—1257
23 味泽昭义. 蚕茧解舒的理化学研究(Ⅱ) 荧光色茧层丝胶溶液的表面张力. 日本蚕糸学雑誌, 1968, 37(2): 123—126
24 徐辉, 封云芳. 桑蚕茧的荧光色、结构和性能研究. 丝绸, 1990, (3): 19-21; (4): 46—47
25 林屋庆三, 杉本哲, 藤本直正. 关于茧色素的研究(Ⅲ)绿茧色素的定性. 日本蚕糸学雑誌, 1959, 28(1): 27—29
26 虞晓华, 刘毅飞. 雌雄蚕茧茧质和丝质差异性分析. 纺织学报, 2005, 26(4): 36—38
27 贾仲伟, 虞晓华, 沈卫德, 等. 荧光茧色判性蚕品种荧苏荧晓饲养初报. 江苏蚕业, 2004, 1: 51—53
28 Kurioka A, Yamazaki M. Purification and identification of flavonoids from the yellow green cocoon shell (Sasammayu) of the silkworm, *Bombyx mori*. Biosci Biotechnol Biochem, 2002, 55(6): 1396—1399[DOI]
29 Onogi A, Osawa K, Yasuda H, et al. Flavonol glycosides from the leaves of *Morus alba* L. Shoyakugaku Zasshi, 1994, 47: 423—425
30 Tamura Y, Nakajima K-I, Nagayasu K-I, et al. Flavonoid 5-glucosides from the cocoon shell of the silkworm, *Bombyx mori*. Phytochemistry, 2002, 59: 275—278[DOI]
31 Katsube T, Imawaka N, Kawano Y, et al. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.)leaves isolated based on LDL antioxidant activity. Food Chem, 2006, 97: 25—31[DOI]
32 Chikara Hirayama, Hiroshi Ono, Yasumori Tamura, et al. Regioselective formation of quercetin 5-O-glucoside from orally administered quercetin in the silkworm, *Bombyx mori*. Phytochemistry, 2008, 69: 1141—1149[DOI]