小菜蛾血淋巴蛋白质双向电泳技术体系的建立及优化*

蔡来来** 李灵顺 邹 琦 毛钟鸣 王世贵***

(杭州市动物进化与适应重点实验室 杭州师范大学 杭州 310036)

摘 要 采用不同方法对小菜蛾 *Plutella xylostella*(L.)血淋巴进行双向电泳研究,建立了一套适用于小菜蛾血淋巴蛋白质组分析的双向电泳体系。从样品处理方案、等电聚焦时间、染色方法等因素对小菜蛾双向电泳结果的影响进行了分析和优化。结果表明,TCA/丙酮沉淀法提取蛋白损失少,图谱均匀清晰,分辨率和重复性更高。不同长度胶条的最佳上样量不同,胶条长度为 7、17、24 cm 时,最佳上样量依次为 20 ~ 50 μg、50 ~ 300 μg、100 ~ 500 μg,而聚焦时间则分别以24 000、50 000、65 000 vhr 为宜。第二向聚丙烯酰胺凝胶的浓度以 12% 为宜,电泳后蛋白点呈均匀分布。银染的灵敏度明显高于考马斯亮蓝染色,可以检测出更多的蛋白点,但考马斯亮蓝染色在后续蛋白点质谱鉴定中具有优势。

关键词 双向电泳,蛋白质组学,小菜蛾

Establishment and optimization of two-dimensional electrophoresis system for proteome analysis of haemolymph in *Plutella xylostella*

CAI Lai-Lai** LI Ling-Shun ZOU Qi MAO Zhong-Ming WANG Shi-Gui***

(Hangzhou Key Laboratory for Animal Adaptation and Evolution, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

Abstract A two-dimensional electrophoresis system suitable for hemolymph proteome analysis in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), was developed. The effects of different experimental conditions; such as sample processing program, IEF time, staining methods, etc, on the results of two-dimensional electrophoresis were analyzed and optimized. The results show that the TCA/acetone precipitation method had less protein loss, a clearer pattern, higher resolution and greater repeatability. Different lengths of gel strip needed different optimum amounts of sample protein and time; for strips 7, 17 and 24 cm in length the optimum amount of sample protein was 20 – 50 μg, 50 – 300 μg and 100 – 500 μg, respectively, and the appropriate focused time was 24 000 vhr, 50 000 vhr and 65 000 vhr, respectively. Strips were subjected to two-dimensional electrophoresis after transfer onto 12% SDS-polyacrylamide gel in order to attain evenly distributed protein spots. Silver staining was significantly more sensitive than Coomassie brilliant blue, resulting in more protein spots being detected, however, Coomassie blue has the advantage that protein spots can be identified by mass spectrometry.

Key words two-dimensional electrophoresis, proteomics, *Plutella xylostella*

现在生命科学的主要研究对象是功能基因组学,包括结构基因组研究和蛋白质组研究等(邓琳,2005)。基因组具有稳定性,但基因的表达方式是错综复杂的,并加上翻译后修饰作用,使蛋白质的结构功能及活性有动态和复杂的变异(曹志成等,2005)。蛋白质是基因功能的直接实施者,对蛋白质结构和功能的研究将直接阐明生命在生理或病理条件下的变化机制。蛋白质本身的存在

* 资助项目:国家自然科学基金项目(30300042)、浙江省自然科学基金项目(Y307551)。

** E-mail: xijiehan@126.com

*** 通讯作者,E-mail: sgwang@mail.hz.zj.cn

收稿日期:2010-04-29,接受日期:2010-11-29

形式以及构象等问题,仍依赖于对蛋白质的直接研究来解决。

等电聚焦/SDS-聚丙烯酰胺双向凝胶电泳(IEF/SDS-PAGE)是分离和分析蛋白质组分的技术(O'Farrell, 1975)。由于双向电泳能够在一张胶上同时分离几千甚至上万个蛋白质点,从而成为了蛋白质组研究的主要支撑技术之一,广泛应用于生物学研究的各个方面,许多模式生物,如小鼠、果蝇、大肠杆菌等都建立了高质量的双向电泳数据库。双向电泳在昆虫学研究领域的应用也变得来越广泛,目前国内外已经有关于许多昆虫种类较为深入蛋白质组学的研究报道,涉及到昆虫免疫调节、生理发育、昆虫行为活动等重要的生物学问题(侯勇, 2007)。

小菜蛾 *Plutella xylostella*(L.)是世界性的十字花科植物主要害虫之一,对全球蔬菜生产具有很大威胁(Talekar and Shelton, 1993)。据报道小菜蛾环境适应能力很强,对许多化学农药产生了很高的抗性(李二虎等, 2001)。本文从小菜蛾血淋巴样品的制备、双向电泳分离条件等方面进行了尝试,以建立适合小菜蛾血淋巴蛋白分离的双向电泳体系,为小菜蛾的蛋白质组研究奠定技术基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　供试昆虫　小菜蛾采自杭州郊区菜田,在人工气候室饲养,供以甘蓝京丰一号,在实验室内进行长期续代培养。饲养条件为温度(25 ± 1)℃,RH65%,光周期 L: D = 14: 10,光照强度 1 000 ~ 1 500 lx。

1.1.2　主要试剂　3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、碘乙酰胺。N,N,N,N'-四胺基乙二胺(TEMED),尿素(Urea),二硫苏糖醇(DTT)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵(AP)、Tris、十二烷基磺酸钠(SDS)、溴酚兰、低熔点琼脂糖、固相 pH 梯度干胶条(7 cm、17 cm、24 cm pH 4-7)、IPG buffer 等均购自 Bra-rad 公司。考马斯亮兰 G250、牛血清白蛋白、甘氨酸(glycerol)、硫代硫酸钠、无水乙酸钠、无水碳酸钠、硝酸银、EDTA 等购自上海生工公司;冰醋酸、甲醇、磷酸、丙酮、甲醛等其他试剂均为国产分析纯;所有溶液均用超纯水配制。

1.2　方法

1.2.1　样品的制备　方法 1:直接裂解法(侯勇, 2007)

选取 2 龄幼虫,体表用 75% 乙醇消毒、蒸馏水清洗,滤纸吸干虫体。在保鲜膜上解剖,用微量毛细管吸取血淋巴,放入离心管,存入 -80 ℃冰箱保存备用。实验时,将血淋巴从 -80 ℃的取出,直接溶于裂解缓冲液中,冰上裂解 2 h;离心(12 000 × g,4℃,10 min),取上清;考马斯亮蓝法定量蛋白浓度,然后上样。

方法 2:TCA/丙酮沉淀法(Song *et al.*, 2008)

将血淋巴从 -80℃取出,溶于 PBS,加适量蛋白酶抑制剂和 DTT 溶液;离心(1 200 × g,4 ℃,5 min),取上清;加三氯醋酸(TCA),使终浓度达到 10%,冰浴 45 min;离心(12 000 × g,4 ℃,25 min),弃上清;沉淀加冰浴丙酮洗涤,离心(12 000 × g,4 ℃,15 min),弃上清,重复 2 次,室温晾置至样品完全干燥为止;用裂解液溶解沉淀;考马斯亮蓝法定量蛋白浓度,然后上样。

比较两种样品制备方法,以获得最佳样品制备方法。

1.2.2　双向电泳方法

(1)等电聚焦的体系优化

采用 Bio-Rad 等电聚焦系统,7 cm 的 IPG 预制胶条 pH 4 ~ 7。取 150 μL 样品的沿着聚焦盘中槽的边缘从左而右线性加入,用镊子轻轻的去除预制 IPG 胶条上的保护层,胶面朝下小心放入等电聚焦电泳槽,在胶条上缓慢滴加一层矿物油,防止胶条水化过程中液体的蒸发,在等电聚焦仪上进行等电聚焦。设置不同的聚焦时间,以获得最佳等电聚焦时间。最佳等电聚焦电泳程序见表 1。

(2)IEF 胶条的平衡

将 IPG 干胶条在含 2% DTT 平衡液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8,6 mol/L 尿素,20% 甘油,2% SDS,2% DTT)中平衡 15 min,然后于含 2.5% 碘乙酰胺的平衡液中平衡 15 min。

(3) SDS-PAGE 电泳

电泳缓冲液为 25 mmol/L Tris,192 mmol/L Gly,0.1% SDS(m/V),pH 8.3。胶浓度为 12%,厚度为 1 mm。在平衡后 IPG 胶条置于 SDS 凝胶上,用封闭液(0.5% 琼脂糖(W/V),0.002% 溴酚蓝)封住顶部(注意胶条与凝胶间不能有气泡)。16 ℃恒温,恒压 50 V 电泳 10 min 后,改用恒压

100 V 电泳至结束。

(4)染色

表 1 等电聚焦电泳(IEF)参数

Table 1 The parameters of isoelectric focusing electrophoresis (IEF)

步骤 Steps	电泳电压(V) Voltage (V)	升压方式 Step-up mode	持续时间 Duration
水化 Hydration	50		12 h
Step 1	100	线性 Linearity	1 h
Step 2	200	快速 Speediness	0.5 h
Step 3	1 000	线性 Linearity	0.5 h
Step 4	4 000	线性 Linearity	1.5 h
Step 5	4 000	快速 Speediness	24 000 vhr
Step 6	500	快速 Speediness	合适时间 Suitable time

注:20 ℃,每根胶条限流 50 μA。

20 ℃, each strip limited to 50 μA.

首先将结束第二向电泳的凝胶剥下放于固定液(50 mL 乙酸,200 mL 甲醇,250 mL 超纯水)中,处理 15 min 后重复该过程一遍,然后用敏化液(150 mL 甲醇,1 g 硫代硫酸钠,34 g 醋酸钠,加超纯水至 500 mL)处理 30 min,再用漂洗液(500 mL 超纯水)清洗凝胶 5 min,重复该过程 2 遍,随即加入银染液(1.25 g 硝酸银,加超纯水至 500 mL)处理 20 min,然后用漂洗液处理 1 min (500 mL 超纯水),再重复该过程一遍,随后使用显色液(12.5 g 碳酸钠,200 μL 甲醛,加超纯水至 500 mL)显色 4 min,然后用终止液处理 10 min (7.3 g EDTA,加超纯水至 500 mL),最后使用漂洗液处理 5 min (500 mL 超纯水),重复该过程 2 遍。

2 结果与讨论

2.1 不同样品处理方法对双向电泳结果的影响

采取不同的方法对小菜蛾血淋巴进行了处理。结果表明,直接裂解法导致蛋白的流失比较大,而 TCA/丙酮沉淀法所获得的蛋白图谱比较清晰,蛋白点比较多,且经过多次重复实验比较,TCA/丙酮沉淀法的双向电泳图谱重复性比较好,而直接裂解法所获得的双向电泳图谱重复性不好,另外 TCA/丙酮沉淀法得到的 2D 图谱其蛋白点形状更为规则,等电点分布也更为均匀。因此,TCA/丙酮沉淀法较适合于小菜蛾血淋巴的双向电泳研究(图 1)。

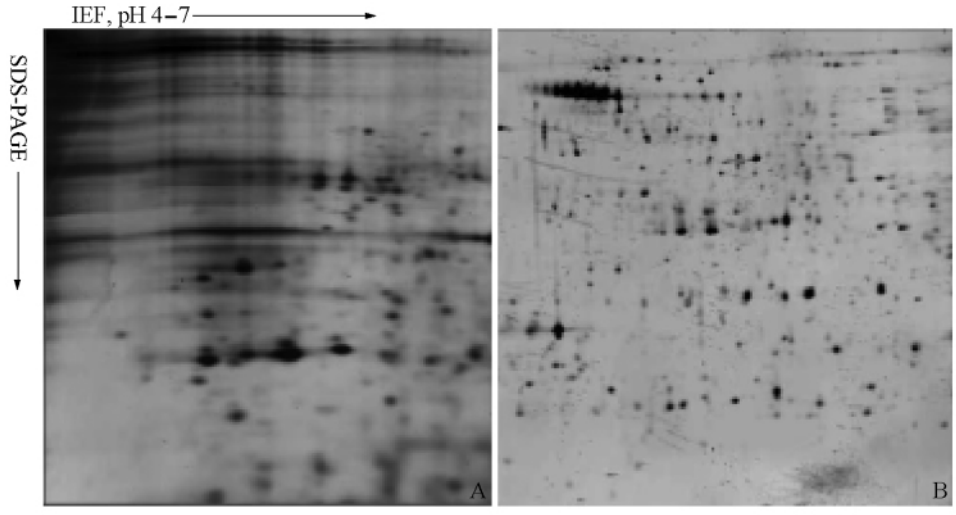


图 1 不同样品制备方法双向电泳银染效果图比较

Fig. 1 The 2-DE maps from different methods of sample

A:直接裂解法;B: TCA/丙酮沉淀法

A: Method of direct schizolysis precitation; B: Method of TCA/acetone precipitation

2.2 不同上样量对双向电泳结果的影响

通过实验确定了不同长度胶条的最佳上样量,胶条长度为 7、17、24 cm 时,最佳上样量依次为 20 ~ 50 μg、50 ~ 300 μg、100 ~ 500 μg。以 7 cm

的胶条为例,蛋白的最佳上样量为 20 ~ 50 μg,主要原因是由于上样量太小会导致蛋白点数量不多,但上样量太多会使量多的蛋白显色太快而导致含量较少的蛋白无法显示出来,从而使点的数量减少(图 2)。

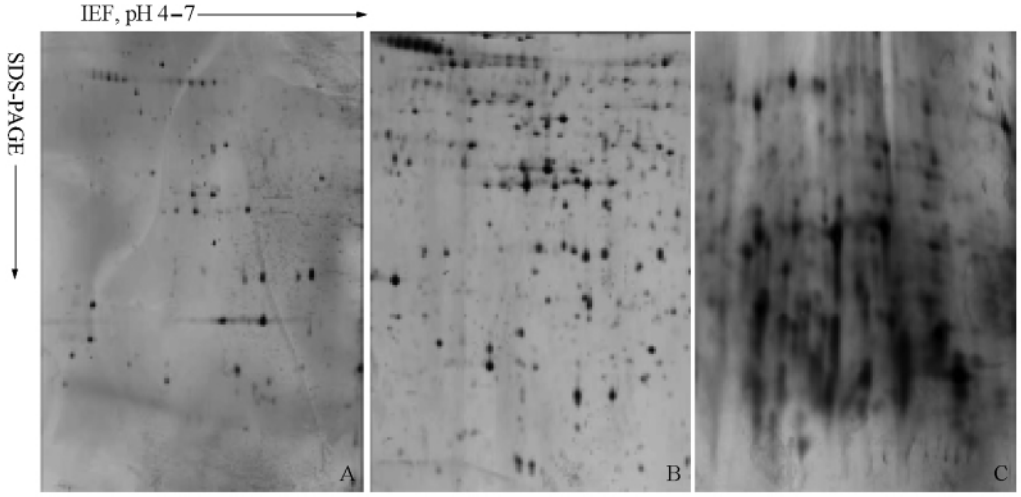


图 2　不同上样量双向电泳银染效果图比较

Fig. 2　Comparison of silver staining 2-DE maps with different loading quantities

A: 15 μg;B: 35 μg;C: 85 μg

2.3　不同等电聚焦对双向电泳结果的影响

采用不同的等电聚焦时间进行双向电泳分析,找到了比较合适的聚焦条件(图 3)。图 3:A 为 17 cm,pH 4 ~ 7 的胶条,聚焦时间为 65 000 vhr 所得到的双向电泳结果,蛋白点虽然较多,但有明显的蛋白点横纹现象,而且发生了蛋白点漂移,此为聚焦时间过长而产生的现象。而图 3:B 是胶条为 17 cm,pH 4 ~ 7 在 50 000 vhr 的聚焦条件下产生的电泳结果,蛋白点不仅较多而且形状比较规则,没有明显的横纹现象,表明聚焦时间比较合适。

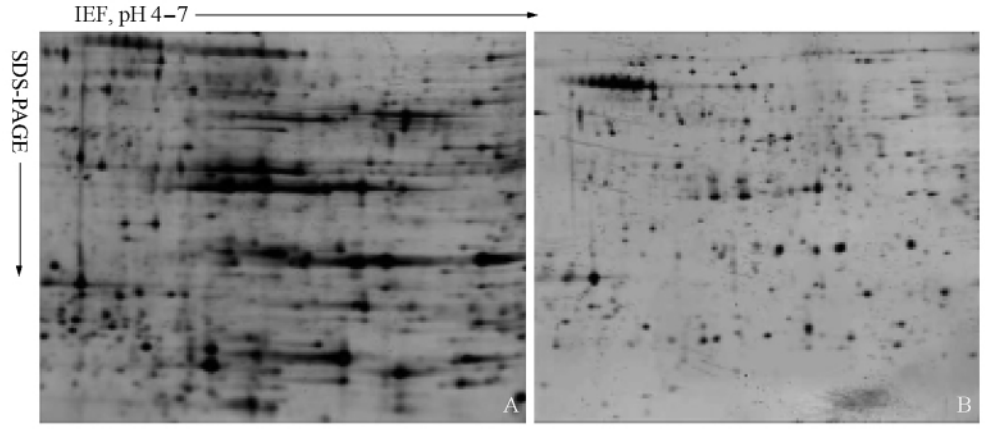


图 3　同聚焦时间双向电泳银染效果图比较

Fig. 3　The 2-DE maps from different isoelectric focusing

A: 聚焦时间为 65 000 vhr;B: 聚焦时间为 50 000 vhr

A: Isoelectric focusing at 65 000 vhr;B: Isoelectric focusing at 50 000 vhr

2.4 不同浓度的 PAGE 胶对双向电泳结果的影响

聚丙烯酰胺凝胶的浓度会影响实验结果，从图 4 中可以看出，浓度太高的胶，蛋白点大都聚集在胶条的上半部分，致使分辨率下降，太低则会使许多小分子的蛋白聚集在凝胶的下方以及边缘处，导致蛋白点的分辨率下降。经比较 10%，12% 和 15% 浓度的聚丙烯酰胺凝胶结果，发现第二向凝胶的浓度在 12% 为宜。12% 的胶中，蛋白点均匀分布。

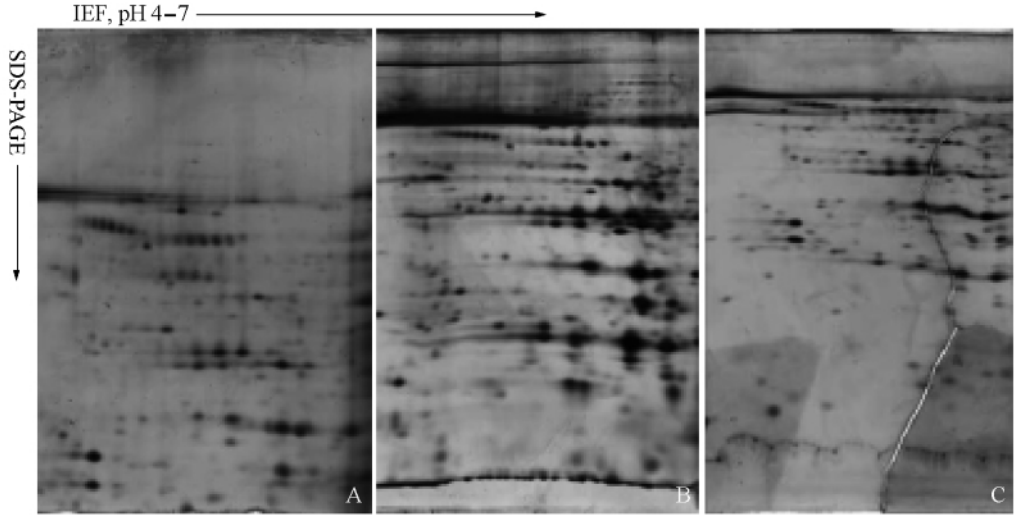


图 4 不同浓度的 PAGE 胶双向电泳图谱银染效果图比较

Fig. 4 The 2-DE maps from different comcentration PAGE gels

A: 10%; B: 12%; C: 15%

2.5 不同染色方法对双向电泳结果的影响

凝胶的显色过程要依样品的上样量来定，银染的灵敏度明显高于考马斯亮蓝染色，银染可以检测出更多的蛋白点，但是考马斯亮蓝染色在后续蛋白点质谱鉴定中具有优势(图 5)。

3 讨论

双向电泳成功的关键在于建立一套有效的、可重复的样品制备方法(Rabilloud, 1996)。样品制备需要 3 种主要的试剂：离液剂(chaotropes)；表面活性剂(sufactants)，也称去垢剂；还原剂(reducing agents)。离液剂主要采用尿素和硫脲，尿素是双向电泳中最常用的变性剂，硫脲则可以帮助许多难溶的蛋白质进行溶解。尿素和硫脲能够破坏蛋白分子间形成的氢键，从而防止由氢键引起的蛋白质聚集以及蛋白迁移中二级结构的形成，另外它能破坏蛋白质的结构，增强蛋白疏水基团与溶液的接触，增强蛋白在溶液中的溶解度(赵从建等，2000；丁勤学等，2001；解建勋等，2001)。尿素浓度一般为 8 M，过低则达不到完全溶解样品的目的，但使用时温度不能过高，以不超过 30℃ 为宜，否则会使蛋白氨基甲酰化，改变蛋白质的等电点。

在样品制备过程中应注意进行高速离心，去除糖类成分，以避免糖类物质对上样的影响。蛋白质的沉淀中，加入 10% 的三氯乙酸，可有效地抑制蛋白酶对蛋白质的水解作用并可去除一些杂质(何瑞锋等，2000)。由于蛋白样品的质量和浓度测定会由于丙酮的存在而受影响，所以在裂解之前因尽量将样品晾干或抽成干粉(何瑞锋等，2000；王桂叶等，2007)。

IEF 运行程序和参数的设置须根据 pH 范围和 IPG 胶条长度而定，同时由于不同样品的蛋白质组成存在差异，需要针对样品来摸索 IEF 运行条件。就小菜蛾而言，7、17 和 24 cm 胶条的聚焦时间分别为 24 000、50 000、65 000 vhr。

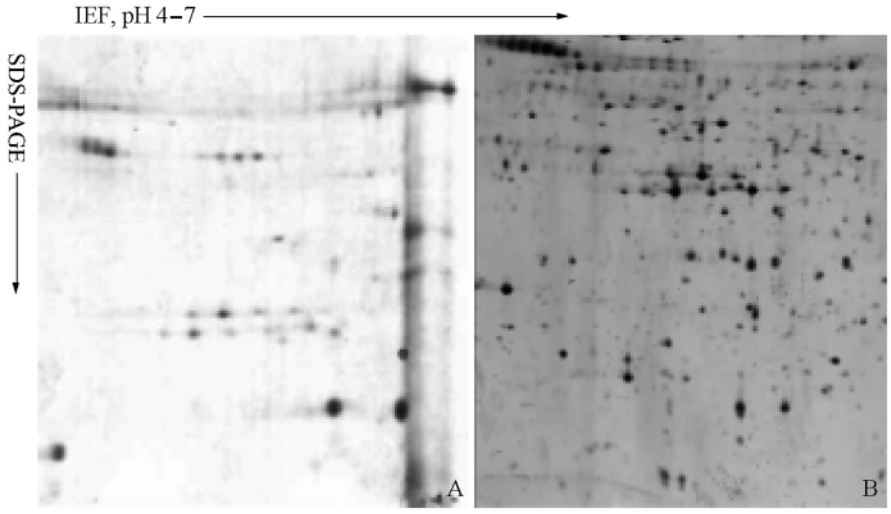


图 5　不同染色方法双向电泳的效果图比较

Fig. 5　The 2-DE maps from Coomassie blue and siliver stain

A: 考马斯亮蓝染色;B: 硝酸银染色

A: by Coomassie blue stained; B: by siliver stained

尽管许多昆虫的基因组测序尚未完成,但功能基因组的研究已经在广泛使用蛋白质组学研究手段。蛋白质组学可以在寄生虫如何调控寄主行为的机理研究方面提供重要线索(Biron *et al.*, 2005)。小菜蛾蛋白质组的研究手段也可以在蛋白质水平上对小菜蛾被寄生蜂寄生后血淋巴中的蛋白质组成变化进行分析,以找出与重要功能相关的关键蛋白,为病虫害的防治和新型农药的开发寻找合适的靶位点,从而设计出更为高效、低毒的杀虫剂。

参考文献(References)

Biron DG, Marche L, Ponton F, Loxdale HD, Galéotti N, Renault L, Joly C, Thomas F, 2005. Behavioural manipulation in a grasshopper harbouring hairworm: a proteomics approach. *Proc. R. Soc. B*, 272: 2117—2126.

曹志成,余坚文,梁荣能,2005. 蛋白质组学——引领后基因时代. 中国生物工程杂志,25(1):33—38.

邓琳,2005. 蛋白质组学趋势和研究进展. 中国科技信息,12:43—44.

丁勤学,贾宇峰,赵从建,阙海萍,郭尧君,刘少君,2001. 两种不同溶液体系提取大鼠脊髓蛋白双向电泳图谱比较. 军事医学科学院院刊,25(1):17—20.

何瑞锋,丁毅,张剑锋,余金洪,2000. 植物叶片蛋白质双向电泳技术的改进与优化. 遗传,22(5):319—321.

侯勇,2007. 家蚕丝腺、血液、脂肪体蛋白质双向电泳及质谱分析. 博士学位论文. 重庆:西南大学.

解建勋,蒲小平,李玉珍,李长龄,2001. 蛋白质组分析技术进展. 生物生理学报,17(1):20—25.

李二虎,吴文君,陈之浩,2001. 0.2% 苦皮藤素乳油抗药性风险评价. 第二届全国植物农药暨第六届药剂毒理学学术讨论会论文集. 434—437.

O'Farrell PH, 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250(10): 4007—4021.

Rabilloud T, 1996. Solubilization of proteins for electrophoresis analyses. *Electrophoresis*, 17 (5): 813—829.

Song KH, Jung MK, Euma JH, Hwang IC, Han SS, 2008. Proteomic analysis of parasitized *Plutella xylostella* larvae plasma. *J. Insect Physiol.*, 54(8): 1271—1280.

Talekar NS, Shelton AM, 1993. Biology, ecology and management of the diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.*, 38: 275—301.

王桂叶,高峰,李静孟, 方华,张清勇,王玉玲,张建立,赵明理,2007. 3 种方法提取胸腺组织蛋白双向电泳纯化结果比较. 郑州大学学报医学版,42(4):660—662.

赵从建,贾宇峰,丁勤学,刘少君,2000. 中枢神经蛋白质组分析中双向电泳技术的建立. 生物化学与生物物理进展,27(6):645—650.