

桔小实蝇幼虫总蛋白双向电泳技术体系的建立和优化*

白蓉蓉^{1,2**} 金涛² 金启安² 林玉英² 温海波² 彭正强^{2***}

(1. 海南大学环境与植物保护学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 农业部热带农林有害生物入侵监测与控制重点开放实验室, 海口 571101)

摘要 【目的】建立和优化桔小实蝇幼虫 *Bactrocera dorsalis* (Hendel)总蛋白的双向电泳条件。

【方法】使用 BPP 法和 3 种 TCA-丙酮法(TCA-丙酮-A 法:直接加入裂解液磨样;TCA-丙酮-B 法:样品提取液中加入 40 mmol/L DTT;TCA-丙酮-C 法:样品提取液中加入 0.07% β-巯基乙醇)提取桔小实蝇幼虫总蛋白;使用 13 cm 和 24 cm pH 4~7 的 IPG 胶条分离桔小实蝇幼虫总蛋白;使用考马斯亮蓝法及硝酸银染色法对双向电泳凝胶进行染色;使用 5800 MALDI-TOF-TOF MS/MS 质谱分析仪对 BPP 法获得的特异蛋白进行质谱鉴定,并将检索数据库物种分别设为 Metazoa (Animals)与 *Drosophila* (Fruit flies)进行数据库检索。【结果】TCA-丙酮法中,TCA-丙酮-C 法提取效果最好,BPP 法优于所有 TCA-丙酮法;使用考马斯亮蓝染色与硝酸银染色效果相当;使用 24 cm 胶条的蛋白分辨率明显高于 13 cm 胶条;检索数据库物种设为 Metazoa (Animals)可获得比 *Drosophila* (Fruit flies)更加全面的信息。【结论】使用 24 cm pH 4~7 的 IPG 胶条对 BPP 法提取的桔小实蝇幼虫总蛋白进行双向电泳,采用考马斯亮蓝法对双向电泳凝胶进行染色,可得到更好的双向电泳图谱,检索数据库时检索物种可优先设为 Metazoa (Animals)。

关键词 桔小实蝇,蛋白质提取方法,双向电泳

Establishment and optimization of a two-dimensional gel electrophoresis system for *Bactrocera dorsalis* (Hendel) larvae crude protein

BAI Rong-Rong^{1,2**} JIN Tao² JIN Qi-An² LIN Yu-Ying² WEN Hai-Bo²
PENG Zheng-Qiang^{2***}

(1. Environment and Plant Protection Department, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Environment and Plant Protection Key Laboratory of Monitoring and Control of Tropical Agricultural and Forest Invasive Alien Pests, Ministry of Agriculture, Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract [Objectives] To establish and optimize 2-DE profiles of crude proteins from the 3th instar larvae of *Bactrocera dorsalis* (Hendel). [Methods] The effectiveness of the BPP protocol and three TCA/acetone precipitation procedures (TCA/acetone A: ground sample with lysis buffer directly, TCA/acetone B: extraction buffer of 10% TCA in acetone containing 40 mmol/LDTT, TCA/acetone C: extraction buffer of 10% TCA in acetone containing 0.07% β-mercaptoethanol), were assessed with respect to crude protein extraction from 3th instar larvae of *Bactrocera dorsalis* (Hendel). Linear gradient 13 and 24 cm IPG strips with pH 4-7 were used to separate the crude protein. The separation gels were visualized by coomassie brilliant blue and silver staining, respectively. Mass spectra of the specific proteins obtained by the BPP method were read on a 5800 MALDI-TOF-TOF MS/MS mass spectrometer and the database of Metazoa (Animals) and *Drosophila* (Fruit flies) was indexed for matches. [Results] The TCA/acetone C precipitation procedure produced the best resolved

* 资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金青年基金项目(31201537); 公益性行业(农业)科研专项经费(201103026)

**第一作者 First author, E-mail: bairongrong1125@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: lypzhq@163.com

收稿日期 Received: 2014-10-16, 接受日期 Accepted: 2015-01-26

protein spots among the three TCA/acetone methods, but the BPP method gave the best distinction of proteins on 2-DE gels. Coomassie brilliant blue staining and silver staining showed similar resolutions. The average protein yield of 24 cm strips was higher than that of 13 cm strips, lots of small proteins were enriched in 24 cm strips. The Metazoa database provided more comprehensive information than that of Drosophila (Fruit flies). [Conclusion] The BPP protocol revealed the most protein spots with linear gradient 24 cm IPG strips, pH 4-7. Coomassie brilliant blue was both sensitive and compatible with MS. Database retrieval should give priority to the Metazoa.

Key words *Bactrocera dorsalis* (Hendel), crude protein extraction methods, two-dimensional gel electrophoresis

蛋白质组学研究可直接阐明生命在生理或病理条件下的变化机制(易发平等, 2006; 蔡来来等, 2011), 现已成为研究昆虫学的有力武器之一, 并在昆虫学研究中得到了广泛应用(黄志伟等, 2007; 叶恭银和方琦, 2011)。双向电泳技术(Two-dimensional electrophoresis, 2-DE)是蛋白质组学研究的核心技术之一, 也是目前最现实有效的分离纯化蛋白质的技术(赵楠等, 2011)。样品制备、IEF 等电聚焦、SDS-PAGE 电泳(SDS-PAGE electrophoresis)等将很大程度上决定结果的稳定性和重复性(Rabilloud *et al.*, 2002)。目前, TCA-丙酮沉淀法是常用的动物蛋白样品制备方法(徐幼平等, 2007), 在高效去除蛋白质样品中盐离子的同时, 能够减少蛋白质水解作用和其它蛋白酶的修饰对蛋白分离结果的影响(Wu and Wang, 1984)。但 TCA-丙酮法是将目标材料中所有能沉淀的物质都沉淀下来, 杂质较多, 所得到的蛋白质样品再溶性较差, 容易造成很多蛋白质的损失, 而且对多糖、色素等杂质的去除效果一般(Görg *et al.*, 2000)。BPP 法是 Wang 等(2007)报道的蛋白提取方法, 该方法可在抑制蛋白酶的同时有效去除脂类、多糖等杂质。凝胶中的蛋白点需染色才能显现, 目前广泛应用的染色方法有考染、银染和荧光染色法(Patton, 2000)。荧光染料价格昂贵且容易淬灭, 其应用也离不开专用仪器设备以及特殊蛋白定量软件, 所以目前应用并不广泛(Patton, 2000)。银染法灵敏度高, 可在纳克级水平上检测凝胶中的蛋白点(Yan *et al.*, 2000)。考马斯亮蓝染色法重复性高, 染色背景极低, 灵敏度较高且具有良好的质谱兼容性, 得到了广泛应用(Candiano *et al.*, 2004)。

Cilia 等(2009)和 Yiou 等(2013)对蚜虫 *Schizaphis graminum* (Rondani) 蛋白提取方法进行了比较优化, 结果表明 TCA-丙酮法提取效果好且重复性高。王滔等(2013)对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenee) 幼虫血浆蛋白提取方法进行了比较优化, 表明 PEG 提取法最适合用于亚洲玉米螟血浆蛋白样品的制备。蔡来来等(2011)对小菜蛾 *Plutella xylostella* (Linnaeus) 血淋巴蛋白提取方法进行了比较优化, 表明 TCA-丙酮沉淀法提取蛋白效果最好。虽然已经有许多的学者对不同动物和昆虫的蛋白提取方法进行了比较优化, 但是适于桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Hendel) 幼虫蛋白提取的方法尚未见报道。我们从桔小实蝇幼虫总蛋白提取方法、IPG 胶条长度、凝胶染色方法几个方面进行了尝试, 以建立适合桔小实蝇幼虫总蛋白的双向电泳条件, 并对得到质谱原始数据后怎么进行数据库比对进行了比较, 找到了建立桔小实蝇幼虫总蛋白双向电泳的体系的方法和条件, 为更好地研究桔小实蝇对药物的抗性提供有利依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

桔小实蝇采集于海南省儋州市宝岛新村附近杨桃树上, 在中国热带农业科学院环境与植物保护研究所养虫室内饲养, 用人工饲料香蕉等继代饲养繁殖 16 代。饲养环境: 温度 26~30℃, 光照周期 16L: 8D, 相对湿度 75%~90%。挑选行为活泼的桔小实蝇 3 龄老熟幼虫作为供试昆虫。

1.2 蛋白质提取

TCA-丙酮-A 法: 参照王国宝等(2011)方

法提取桔小实蝇幼虫总蛋白,略有改动。取桔小实蝇 3 龄老熟幼虫 1 g,置于预冷的研钵中。加入少量液氮速冻,加入石英砂和 2 mL 样品裂解液,冰浴研磨 3~4 min。转移至离心管中,4℃,12 000 g 离心 15 min,取上清液,加入 3 倍体积的丙酮和 1 倍体积的 TCA, -20℃条件下沉淀 1 h,4℃,12 000 g 离心 15 min,弃上清。沉淀用预冷丙酮润洗 2 次,待丙酮挥发后用适量裂解液溶解待用。

TCA-丙酮-B 法:参照 Yang 等(2007)和张娜娜等(2011)方法提取桔小实蝇幼虫总蛋白,略作改动。将桔小实蝇幼虫在液氮中研磨 2 min,取 1 g 样品放入盛有 5 mL 样品提取液的离心管中, -20℃条件下沉淀过夜。4℃,15 000 g 离心 30 min,弃上清。沉淀重悬于含 40 mmol/L DTT 的 3 mL 预冷丙酮中, -20℃条件下沉淀 1 h。15 000 g 离心 30 min,弃上清。沉淀用预冷的丙酮洗涤两次,室温待丙酮挥发后,加入适量样品裂解液溶解沉淀,22℃恒温放置 2 h,20℃,15 000 g 离心 30 min,取上清。

TCA-丙酮-C 法:参照 Thiellement 等(2007)方法略作改动。用 0.07% (V/V)的 β -巯基乙醇代替 DTT,其他操作同 TCA-丙酮-B 法。

BPP(Borax/PVPP/Phe)法:参考基于酚抽法改进的 BPP 法,提取桔小实蝇幼虫总蛋白(Saravanan and Rose,2004;Wang *et al.*,2007)。取桔小实蝇幼虫 1 g,倒入少量液氮冰浴研磨 2 min 后,加入盛有 8 mL BPP 提取缓冲液(100 mmol/L EDTA,50 mmol/L 硼砂,50 mmol/L 维生素 C,1% PVPP,1% Triton X-100,2% β -巯基乙醇,30% 蔗糖,10 mmol/L Tris 碱,pH 8.0)的离心管中,室温涡旋 10 min,加入 5 mL Tris-饱和酚,室温涡旋 10 min。4℃,15 000 g 离心 15 min。转移上层酚相至新的离心管中,加入 5 mL BPP 提取缓冲液,室温涡旋 10 min,4℃,15 000 g 离心 15 min,重复操作至中间白色沉淀物完全去除。转移上清液至 10 mL 离心管,每管 1 mL 上清液,加入 5 mL AM 沉淀剂(过饱和的硫酸铵甲醇溶液), -20℃条件下沉淀过夜。4℃,15 000 g 离心 15 min,弃上清。使用 1~2 mL 预冷的甲醇

洗涤沉淀,4℃,15 000 g 离心 15 min,弃上清。使用 1~2 mL 预冷的丙酮洗涤沉淀,4℃,15 000 g 离心 15 min,弃上清,重复一次。室温待丙酮挥发干净后,使用适量的样品裂解液溶解沉淀。

1.3 蛋白定量

采用 Bradford 法对蛋白质进行定量(Bradford,1976)。使用浓度为 1 mg/mL 的牛血清白蛋白作为标准品。

1.4 双向电泳

采用被动水化上样方法,使用 pH 4—7 的 IPG 胶条,水化 16 h 左右。13 和 24 cm 胶条蛋白上样量分别为 700 和 1 300 μ g,上样体系总体积分别为 255 和 455 μ L。等电聚焦仪为 Ettan IPGphor II (GE Healthcare),13 cm 胶条聚焦程序:250 V,3 h;500 V,2 h;1 000 V,1 h;8 000 V,70 000 Vhr。24 cm 胶条聚焦程序与 13 cm 胶条一致,只将 8 000 V,70 000 Vhr 改为 8 000 V,110 000 Vhr。IEF 等电聚焦结束后,用 1%的 DTT 平衡液(50 mmol/L Tris-HCl,6 mol/L 尿素,30%甘油,2% SDS,0.002%溴酚蓝,1% DTT)平衡胶条 15 min。使用 ddH₂O 冲洗干净后,用 4%的 IAA 平衡液(用 4% IAA 替换 1% DTT)平衡胶条 15 min。使用 Ettan Daltsix 垂直电泳仪(GE Healthcare)进行 SDS-PAGE 电泳。平衡结束后,使用 ddH₂O 将胶条冲洗干净,转移胶条至 12.5%的聚丙烯酰胺凝胶上,避免产生气泡。使用 1%的琼脂糖封胶液密封胶条。电泳起始功率为 6 W/Gel 电泳 1 h 后设置为 8 W/Gel,待溴酚蓝指示剂到达凝胶底部时停止电泳。

1.5 凝胶的染色和扫描

考马斯亮蓝染色:采用 Wang 等(2012)改进的考马斯亮蓝 G250 染色法。

硝酸银染色:采用基于 Shevchenko 等(1996)改进银染法对完成电泳的凝胶染色,具体步骤参考 Magdeldin (2012)。

凝胶扫描和胶图分析:采用 ImageScanner III 投射扫描仪(GE Healthcare)对双向电泳得到的凝胶进行扫描,扫描得到的胶图使用

ImageMaster 2D Platinum 5.0 (Amersham Bioscience) 分析统计蛋白点的个数。

1.6 质谱鉴定和生物信息学分析

蛋白点胶内酶解：精确挖取目标蛋白点胶粒，并做标记。具体步骤参考王旭初等（2007）的简化胶内酶解法进行胶内酶解。

质谱鉴定：将上清蛋白酶解液与饱和的 α -氰基-4-羟基肉桂酸基质混合均匀，取样品 1 μ L 点靶，重复 3 次，蛋白样品干燥后使用 0.1% 的 TFA 溶液清洗，使用 5800 MALDI-TOF-TOF MS/MS 质谱分析仪 (AB SCIEX) 进行质谱鉴定。获得相应蛋白的肽段图谱和蛋白信息数据。

使用 Mascot Distiller 对获得的质谱数据进行分析。检索数据库 NCBI nr，物种分别设为 Metazoa (Animals) 和 *Drosophila* (Fruit flies)，

选择胰蛋白酶酶解，允许一个位点漏切，固定修饰为 Carbamidomethyl (C)，可变修饰为 Oxidation (M)，肽段偏差为 ± 300 ppm。如果 Mascot Score 分别超过 53 和 39 分，且匹配值小于 0.05，则该蛋白可能被鉴定成功，得分越高，可信度越高。

数据分析：蛋白质的点个数以均数 $\pm$ 标准误表示，应用 DPS 数据处理系统，进行 Tukey 多重比较法测验不同处理间的差异显著性水平。

2 结果与分析

2.1 3 种 TCA-丙酮提取方法双向电泳结果比较

利用双向电泳技术对 3 种 TCA-丙酮提取方法得到的蛋白进行分离，使用 ImageMaster 2D Platinum 5.0 (Amersham Bioscience) 分析统计蛋白点的个数。结果显示，TCA-丙酮-A 法 (图 1：

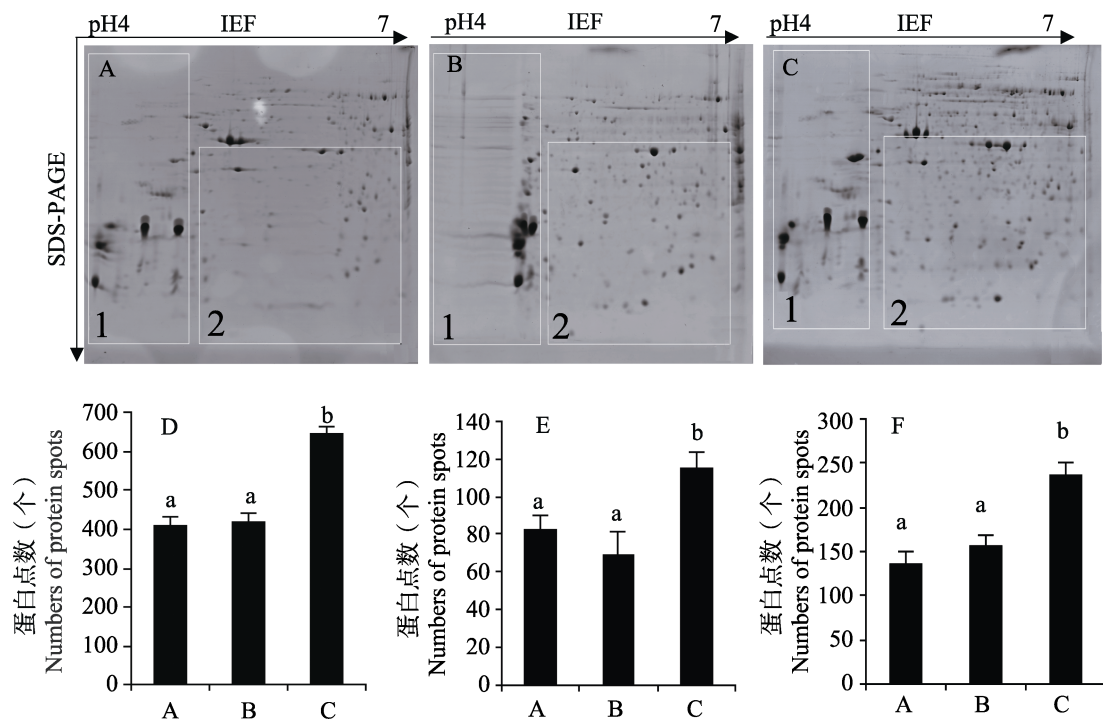


图 1 TCA-丙酮 3 种蛋白提取方法的 2-DE 图谱比较

Fig. 1 Comparison of 2-DE results of proteins extracted by three TCA/acetone methods

A. TCA-丙酮-A 法；B. TCA-丙酮-B 法；C. TCA-丙酮-C 法；D. 3 种提取方法 2-DE 总蛋白点个数；E. 3 种提取方法区域 1 中蛋白点个数；F. 3 种提取方法区域 2 中蛋白点个数。柱上标有不同小写字母不同表示在 0.05 水平差异显著，否则差异不显著。下图同。

A. TCA/acetone A; B. TCA/acetone B; C. TCA/acetone C; D. Numbers of protein spots among the three extraction methods; E. Numbers of protein spots among the three extraction methods in region 1; F. Numbers of protein spots among the three extraction methods in region 2. Histograms with different small letters indicate significant difference at 0.05 level, the same letters indicate no significant difference. The same below.

A) 和 TCA-丙酮-B 法 (图 1:B) 提取桔小实蝇总蛋白, 双向电泳分离得到的蛋白点个数较少, 分别为 (409 ± 23) 和 (420 ± 20) 个 (图 1:D), TCA-丙酮-C 法 (图 1:C) 提取桔小实蝇幼虫总蛋白, 双向电泳分离得到的蛋白点个数明显增加, 可以分离得到 (646 ± 18) 个蛋白点 (图 1:D)。3 种提取方法在区域 1 的蛋白点个数分别为 82 ± 8 、 69 ± 12 和 115 ± 8 (图 1:E), 区域 2 的蛋白点个数分别为 135 ± 15 、 155 ± 13 和 236 ± 13 (图 1:F), TCA-丙酮-C 法在这两个区域获得的蛋白都明显多于另外两种方法。从双向电泳结果图谱中, 可以看出样品提取液中加入 DTT, 酸性端有明显的横纹, 且蛋白点向碱性端聚集, 集中于 pH5 的位置。样品提取液中加入 β -巯基乙醇, 不仅可以利用双向电泳技术分离到更多的蛋白, 且蛋白点圆润, 富有层次感, 拖尾也较少。

2.2 不同 IPG 胶条长度对 TCA-丙酮-C 法获得的蛋白的分离效果

使用 24 cm 胶条分离得到 $(1\,129 \pm 46)$ 个蛋白点, 较 13 cm 胶条增加了 483 个蛋白点。使用不同长度的胶条得到的图谱在选定区域内 (图 2 中 5 个放大区域), 蛋白点的聚焦质量和丰度都有很大的差异。使用 24 cm 胶条可以较好的分离不同的蛋白, 蛋白点轮廓清晰, 且使用 24 cm 胶条分离蛋白有利于更多低丰度蛋白的显现。图中箭头所示的蛋白点即为使用 24 cm 胶条分离得到的低丰度蛋白。

2.3 TCA-丙酮-C 法与 BPP 法提取桔小实蝇幼虫总蛋白双向电泳结果比较

如图 3 所示, 使用 BPP 法提取桔小实蝇幼虫总蛋白可以获得 $(1\,187 \pm 42)$ 个蛋白点, 比使

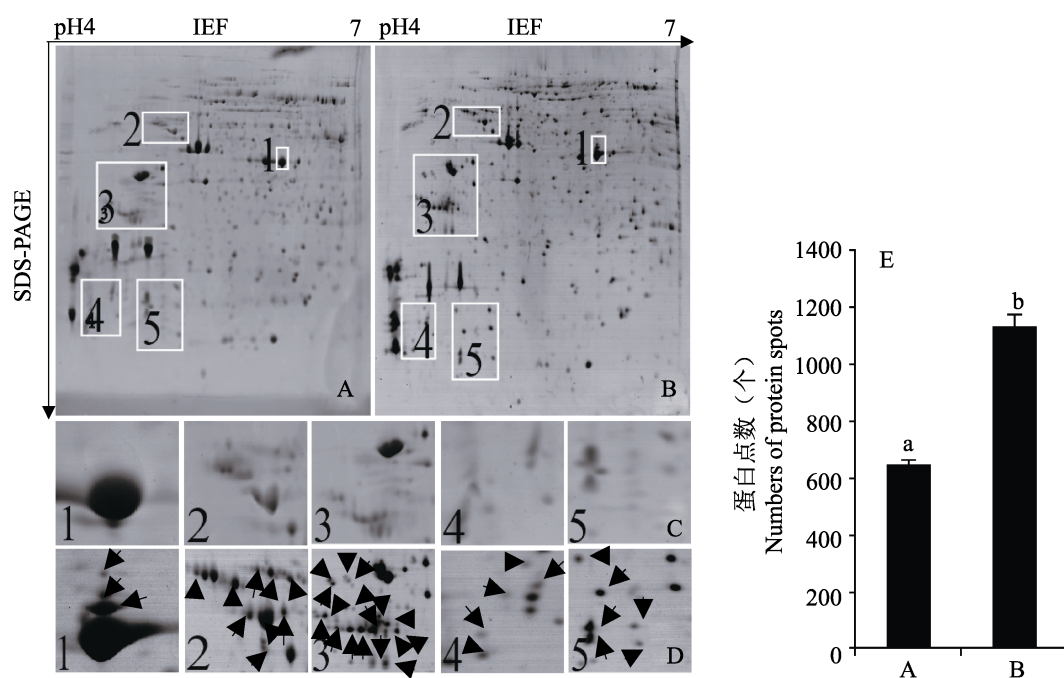


图 2 TCA-丙酮-C 法在不同 IPG 胶条长度下 2-DE 图谱比较

Fig. 2 Comparison of 2-DE results of proteins extracted by TCA/acetone C in different IPG strip lengths

A. IPG 胶条长 13 cm; B. IPG 胶条长 24 cm; C. A 图中数字 1~5 个区域放大效果图; D. B 图中数字 1~5 个区域放大效果图; E. 13 cm 胶条和 24 cm 胶条获得的蛋白总数。箭头表示 24 cm 胶中特异蛋白点。

A. 13 cm IPG strip, pH 4-7; B. 24 cm IPG strip, pH 4-7; C. Magnified of the 5 regions (number 1-5) in A; D. Magnified of the 5 regions (number 1-5) in B; E. Numbers of protein spots between 13 cm and 24 cm strips. The specific protein spots on the 24 cm gel were showed with the arrows.

用 TCA-丙酮-C 法增加 58 个蛋白点。图中箭头显示使用 BPP 法分离得到而 TCA-丙酮-C 法未分离到的蛋白点。BPP 法不仅能够获得更多的蛋白点,且使用 BPP 法分离到的蛋白点分辨率更高,蛋白点更加清晰,基本呈圆形或椭圆形,横向和纵向都少有拖尾(图 3:B)。两种方法得到的胶在选定的区域内(图 3 中放大的 6 个区域),许多蛋白点的丰度有很大差异,且 BPP 法得到的胶上有许多低丰度蛋白得以显现。

2.4 染色方法的建立与优化

使用硝酸银染色可获得(425±24)个蛋白点,考马斯亮蓝染色可获得(409±23)个蛋白点(图 4:C)。硝酸银染色法更加利于蛋白点的显现,蛋白点圆润清晰,没有明显的拖尾现象,且在整张胶上分布也较均匀,但胶的背景较差,许多水渍状背景不易脱色,影响某些蛋白的显现(图 4:B)。考马斯亮蓝染色法获得的蛋白点也较圆润,

没有明显拖尾,且背景干净清晰。

2.5 质谱鉴定的生物种类比较

通过比较可知,使用 BPP 法提取桔小实蝇幼虫总蛋白可以获得更多的蛋白点(图 3)。选取了 BPP 胶(图 3:B;图 5 是其大图)中 10 个特异的蛋白点进行质谱鉴定。以 Metazoa (Animals) 为检索物种可成功检索 9 个蛋白(表 1),分别为中间丝相关蛋白类似物、甘油-3-磷酸脱氢酶、烯醇酶(B 型)、磷酸丙糖异构酶类似物、过氧化物还原酶-2 类似物、GK10641、酚氧化酶原 1、线粒体乙醛脱氢酶类似物,但多数为预测蛋白。对 GK10641 进行 Blast 分析,该蛋白可能为丝切蛋白/肌动蛋白解聚因子同源物。以 *Drosophila* (Fruit flies) 为检索物种可成功检索 6 个蛋白(表 2),分别为甘油-3-磷酸脱氢酶、未命名蛋白、过渡内质网 ATP 酶、GJ10377、GK10641、醛脱氢酶(A 型)。分别对表 2 中的

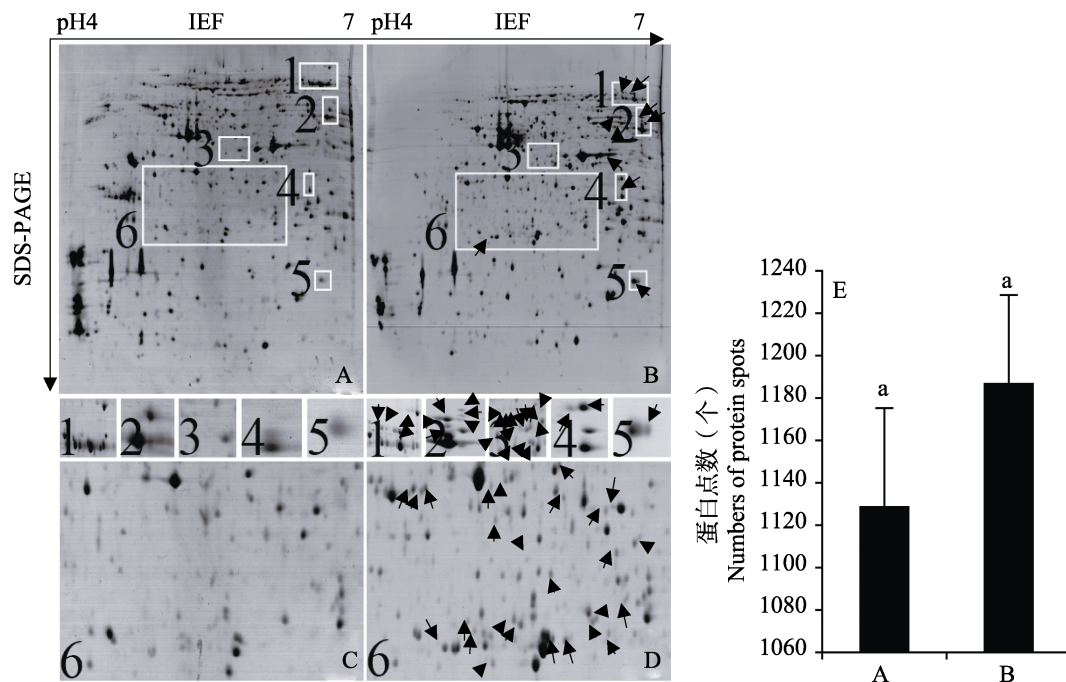


图 3 TCA-丙酮-C 法与 BPP 法 2-DE 图谱比较

Fig. 3 Comparison of 2-DE results of proteins extracted by TCA/acetone C and BPP

- A. TCA-丙酮-C 法; B. BPP 法; C. A 图中数字 1~6 个区域放大效果图; D. B 图中数字 1~6 个区域放大效果图;
E. TCA-丙酮-C 法和 BPP 法获得的总蛋白点个数。箭头表示 BPP 法特异获得的蛋白点。
A. TCA/acetone C; B. BPP; C. Magnified of the 6 regions (number 1-6) in A; D. Magnified of the 6 regions (number 1-6) in B; E. Numbers of protein spots between the two extraction methods. The specific protein spots on the BPP gel were showed with the arrows.

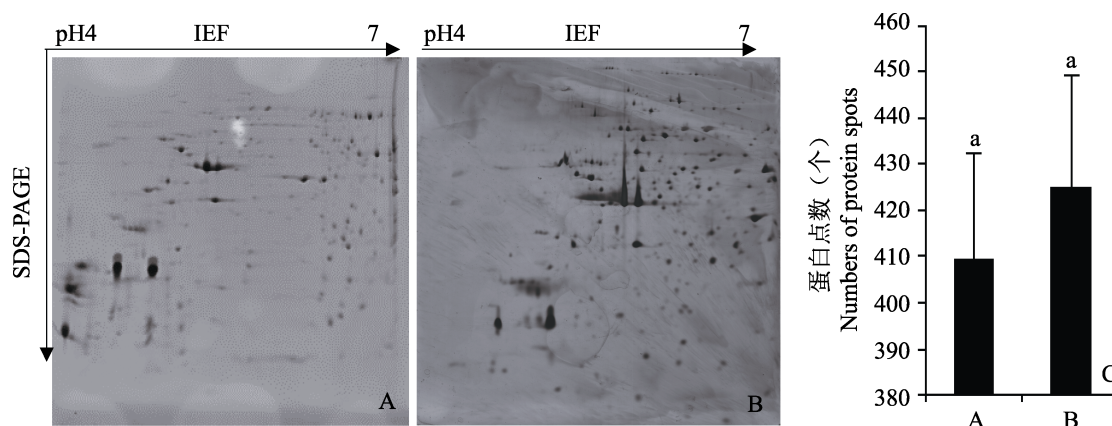


图 4 硝酸银染色与考马斯亮蓝染色效果比较

Fig. 4 Comparison of 2-DE maps visualized by coomassie brilliant blue staining and silver staining

A. 考马斯亮蓝染色; B. 硝酸银染色; C. 两种染色方法获得的蛋白点个数。

A. Coomassie brilliant blue staining; B. Silver nitrate staining; C. Numbers of protein spots between the two staining methods.

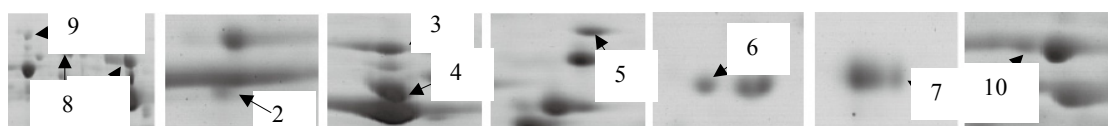


图 5 BPP 胶上质谱鉴定的 10 个特异蛋白点

Fig. 5 The 10 specific protein spots on BPP gels for mass spectrometry

1~10: BPP 胶上用于质谱鉴定的 10 个特异蛋白点。

1-10: The 10 specific protein spots on BPP gels for mass spectrometry.

未命名蛋白、GJ10377、GK10641 进行 Blast 分析,结果显示这几个蛋白分别为烯醇酶(B型)、短轴 2(A 亚型)、丝切蛋白/肌动蛋白解聚因子同源物。

3 结论与讨论

TCA-丙酮沉淀法作为动物蛋白质提取的经典方法,已经有多种改进的版本,都有各自的优点,本文中用到的 3 种方法在丙酮沉淀液中加入了不同的还原剂,结果也各有优点,加入裂解液溶解 TCA-丙酮三种方法获得的蛋白,TCA-丙酮-A 法获得的蛋白呈淡黄色,并有少量絮状沉淀。TCA-丙酮-B 法和 TCA-丙酮-C 法获得的蛋白虽然颜色几乎透明,但离心后许多胶状沉淀。DTT 和 β -巯基乙醇的加入均有效地抑制了蛋白的氧化,但是 DTT 浓度高会造成酸性端横条纹,也会影响样品的 pH 梯度(高璇等,2008;韩吉春

等,2012)。而本研究中 BPP 提取液中的各种试剂都起到了非常好的作用,Triton X-100 是一种非离子去污剂,可有效破坏脂质-脂质和脂质-蛋白之间的相互作用以而分离膜蛋白,PVPP 和硼砂可有效去除多糖、多酚等干扰物质,维生素 C 与 β -巯基乙醇可以有效抑制酚的氧化(Wang *et al.*, 2007)。充分研磨可增加蛋白产率,为防止蛋白氧化,可加入适量 PVPP 并在液氮中研磨。使用 BPP 法提取桔小实蝇幼虫总蛋白时,加入 BPP 提取液及时充分涡旋 10 min 后加入 Tris-饱和酚再次充分涡旋 10 min,涡旋过程中可将离心管置于冰中降温。使用 BPP 提取液抽提除杂的次数视中间沉淀层的情况而定,中间沉淀层厚则表示蛋白杂质含量较多,提取的蛋白不纯,影响后续双向电泳分离等工作,但过多次的抽提数会造成蛋白损失,所以应在中间沉淀层较薄或几乎没有时即将上清液转入 AM 沉淀剂中,然后置于

表 1 BPP 胶上特异蛋白点的 MALDI-TOF-TOF MS 鉴定结果
Table 1 Identification of the protein spots on BPP gels by MALDI-TOF-TOF MS

蛋白 位点 Spot no.	理论等电点/分子 量 (ku) 实验等电点/分子 量 (ku) Theor PI/Mr(ku) Exp.PI/Mr(ku)	Mascot 检索 得分 Mascot score	匹配的 肽段 Matched peptide	肽段覆 盖率 Sequence coverage (%)	NCBI 登录号 Accession no. in NCBI	来源物种 Insect species	蛋白名称 Protein name
1	6.12/63.892 6.7/99.56	242	4(3)	10	gi 498941004	<i>Ceratitis capitata</i>	PREDICTED: filaggrin-2-like isoform X2
2	7.68/28.946 6.45/41.82	462	6(5)	30	gi 1945505	<i>Ceratitis capitata</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase, partial
3	7.18/53.648 6.79/62.67	854	10(7)	23	gi 499007881	<i>Ceratitis capitata</i>	PREDICTED: enolase-like
4	7.18/53.648 6.79/58.25	1 006	11(8)	23	gi 499007881	<i>Ceratitis capitata</i>	PREDICTED: enolase-like
5	8.84/31.902 6.6/35.0	294	5(3)	22	gi 499000459	<i>Ceratitis capitata</i>	PREDICTED: triosephosphate isomerase-like
6	6.08/26.498 5.29/24.2	210	4(1)	21	gi 499009502	<i>Ceratitis capitata</i>	PREDICTED: peroxiredoxin-2-like
7	6.82/17.551 6.75/18.6	428	7(4)	51	gi 195425594	<i>Drosophila willistoni</i>	GK10641 (PREDICTED: cofilin/actin-depolymerizing factor homolog)
8	5.99/78.512 6.59/105.12	53	2(0)	3	gi 400295074	<i>Bactrocera cucurbitae</i>	prophenoloxidase 1
9	6.73/0.868 6.51/107.9	27	1(0)	100	gi 1334055	<i>Mus musculus</i>	unnamed protein product
10	6.58/57.591 6.53/62.67	497	7(4)	15	gi 498925946	<i>Ceratitis capitata</i>	PREDICTED: aldehyde dehydrogenase, mitochondrial-like

- 20℃ 沉淀过夜。甲醇主要是去除蛋白沉淀中色素等杂质,动物蛋白中色素含量相对较少,可只用甲醇洗涤蛋白沉淀一次,然后用丙酮洗涤两次去除甲醇和其他杂质。为确保样品充分溶解,可在加入样品裂解液后于 22℃ 恒温放置 2 h 裂解样品,然后高速离心 30 min 以去除多糖等不溶杂质。我们发现使用 BPP 法提取桔小实蝇幼虫总蛋白,加入样品裂解后,沉淀即可溶解,呈无色透明状,离心后几乎没有沉淀。

染色作为蛋白可视化的关键步骤是很重要的,染色方法的选择是结果好坏的重要因素之一。我们发现使用硝酸银染色法,蛋白点能够更好的显现,但硝酸银染色法对水质要求高,且背景不易脱干净,有水渍状污染。也曾有报道指出硝酸银染色不仅操作要求高,步骤繁琐,背景深

度不一致,且戊二醛等物质对蛋白进行不可逆修饰,严重干扰后期的质谱鉴定工作 (Candiano *et al.*, 2004)。考马斯亮蓝染色法经 Wang 等 (2012) 改良后,其灵敏度接近银染。使用改良的考马斯亮蓝染色法在适当加大上样量后可以达到与硝酸银染色相当的效果,且染色过程简单,同时具有良好的质谱兼容性。权衡后,作者认为采用考马斯亮蓝染色的染色法容易得到效果理想且重复性好的实验结果。

不同长度的胶条由于承载量和凝胶上 pH 的分布不同造成了分离效果上的差异,24 cm 胶条在承载量上比 13 cm 胶条要高出不少,这使得许多低丰度的蛋白质能够被染色剂结合,从而在凝胶上显现出来,可以得到更多的蛋白点。由于 24 cm 胶条的长度更长,在相同 pH 范围的时候,

表 2 BPP 胶上特异蛋白点的 MALDI-TOF-TOF MS 鉴定结果

Table 2 Identification of the specific protein spots on BPP gels analyzed by MALDI-TOF-TOF MS

蛋白 位点 Spot no.	理论等电点/分 子量 (ku) 实验等电点/分 子量(ku)Theor. PI/Mr (ku) Exp.PI/Mr (ku)	Mascot 检 索得分 Mascot score	匹配的 肽段 Mathed peptide	肽段覆 盖率 Sequence coverage (%)	NCBI 登录号 Accession no. in NCBI	来源物种 Insect species	蛋白名称 Protein name
1	4.88/84.208	35	12	1	gi 194864968	<i>Drosophila erecta</i>	GG14821
2	6.75/39.252 6.45/41.82	324	4(3)	13	gi 9176	<i>Drosophila virilis</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+)
3	6.25/157.221 6.79/62.67	338	4(3)	14	gi 7946	<i>Drosophila melanogaster</i>	unnamed protein product (enolase, isoform B)
4	6.25/157.221 6.79/58.25	324	12	14	gi 195494208	<i>Drosophila yakuba</i>	Transitional endoplasmic reticulum ATPase
5	8.05/33.951 6.6/35.00	113	1(1)	4	gi 195494208	<i>Drosophila virilis</i>	GJ10377 (short spindle 2, isoform A)
6	8.98/79.092 5.29/24.2	31	1(0)	14	gi 195398941	<i>Drosophila virilis</i>	GJ15886
7	6.82/17.551 6.75/18.60	428	7(6)	51	gi 195425594	<i>Drosophila willistoni</i>	GK10641(PREDICTED: cofilin/actin-depolymerizing factor homolog)
8	5.63/112.909 6.59/105.12	23	1(0)	1	gi 194747316	<i>Drosophila ananassae</i>	GF25036
9	9.00/18.519 6.51/107.9	20	1(0)	5	gi 195494208	<i>Drosophila yakuba</i>	GH21868
10	6.37/57.325 6.53/62.67	110	2(2)	2	gi 20129399	<i>Drosophila melanogaster</i>	aldehyde dehydrogenase, isoform A

其分辨率更高，使整个图谱看起来更加美观。

此外，采用 BPP 法提取桔小实蝇幼虫总蛋白可获得一些特异的蛋白点，我们选取了 10 个 BPP 胶中特异的蛋白点进行质谱鉴定。以 Metazoa (Animals) 为检索物种可成功检索出 9 个蛋白，且分数较高，与地中海实蝇 *Ceratitits capitata* (Wied) 的匹配率较好，并且以此物种检索结果中涵盖以 *Drosophila* (Fruit flies) 为检索物种的检索结果 ,所以在检索数据库时可优先选择 Metazoa (Animals) 作为检索物种。

参考文献 (References)

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation o f microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1): 248–254.

Candiano G, Ruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG, 2004. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25(9): 1327–1333.

Cai LL, Li LS, Zou Q, Mao ZM, Wang SG, 2011. Establishment and optimization of two-dimensional electrophoresis system for proteome analysis of haemolymph in *Plutella xylostella*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(2): 332–337. [蔡来来, 李灵顺, 邹琦, 毛钟鸣, 王世贵, 2011. 小菜蛾血淋巴蛋白质双向电泳技术体系的建立及优化. *应用昆虫学报*, 48(2): 332–337.]

Cilia M, Fish T, Yang X, McLaughlin M, Thannhaauser TW, Gray S, 2009. A comparison of protein extraction methods suitable for gel-based proteomic studies of aphid proteins. *Jouranal of Biomolecular Techniques*, 20(4): 201–215.

Gao X, Gao LY, Yan YM, 2008. Optimization of extraction method of wheat grain glutenins and two- dimensional electrophoretic analysis. *Journal of Triticeae Crops*, 28(6): 971–976. [高璇, 高利艳, 晏月明, 2008. 小麦籽粒谷蛋白提取方法的优化与双向电泳分析. *麦类作物学报*, 28(6): 971–976.]

- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W, 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with Immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 21(6): 1037–1053.
- Han JC, Cui HF, Shi PT, Zhu SJ, Ye ZH, Yu XP, 2012. Development of two-dimensional electrophoresis protocol suitable for proteomic analysis of cotton leaves. *Cotton Science*, 24(1): 27–34. [韩吉春, 崔海峰, 时鹏涛, 祝水金, 叶子弘, 俞晓平, 2012. 棉花叶片双向电泳体系的研究. *棉花学报*, 24(1): 27–34.]
- Huang ZW, Huang YP, Du JW, 2007. Application of proteomics in entomology research. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(1): 37–41. [黄志伟, 黄勇平, 杜家纬, 2007. 蛋白质组学方法在昆虫学研究中的应用. *昆虫知识*, 44(1): 37–41.]
- Magdeldin S, 2012. Gel Electrophoresis-Advanced Techniques. America: InTech. 327–358.
- Thiellement H, Zivy M, Damerval C, Méchin V, 2007. Plant Proteomics. America: Humana Press. 1–8.
- Patton WF, 2000. A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis*, 21(6): 1123–1144.
- Rabilloud T, Heller M, Gasnier F, Luche S, Rey C, Aebersold R, 2002. Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress evidence for *in vivo* overoxidation of peroxiredoxins at their active site. *Journal of Biological Chemistry*, 277(22): 19396–19401.
- Saravanan RS, Rose JC, 2004. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics*, 4(9): 2522–2532.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M, 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68(5): 850–858.
- Wang GB, Chen YH, Wang JM, Wei ZG, Xu YX, Li B, Shen WD, 2011. Analysis of proteins in the antennae of *Bombyx mori* moths by two dimensional electrophoresis. *Acta Entomologica Sinica*, 54(5): 589–595. [王国宝, 陈玉华, 王举梅, 卫正国, 许雅香, 李兵, 沈卫德, 2011. 家蚕触角蛋白的双向电泳分析. *昆虫学报*, 54(5): 589–595.]
- Wang T, Yang X, Yi JK, Wang Y, Sun Yu, XI JH, 2013. A comparison of protein extraction methods suitable for plasma protein of Asian corn borer larva. *Journal of Environmental Entomology*, 35(2): 264–268. [王滔, 杨翼, 衣建坤, 王玉, 孙宇, 席景会, 2013. 亚洲玉米螟幼虫血浆蛋白提取方法的比较. *环境昆虫学报*, 35(2): 264–268.]
- Wang XC, Li XF, Deng X, Han HP, Shi WL, Li YX, 2007. A protein extraction method compatible with proteomic analysis for the euhalophyte *Salicornia europaea*. *Electrophoresis*, 28(21): 3976–3987.
- Wang XC, Wang DY, Wang D, Chang LL, Yi XP, Peng M, Guo AP, 2012. Systematic comparison of technical details in CBB methods and development of a sensitive GAP stain for comparative proteomic analysis. *Electrophoresis*, 33(2): 296–306.
- Wang XC, Fan PX, Li YX, 2007. A simplified method of in-gel digestion for mass spectrometry analysis. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 33(5): 449–455. [王旭初, 范鹏祥, 李银心, 2007. 一种适用于质谱分析的简化胶内酶解方法. *植物生理与分子生物学报*, 33(5): 449–455.]
- Wu FS, Wang MY, 1984. Extraction of proteins for sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis from protease-rich plant tissues. *Analytical Biochemistry*, 139(1): 100–103.
- Xu YP, Xu QF, Cai XZ, 2007. Optimization of total protein extraction from tomato leaves for two-D gel electrophoresis analysis. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 19(2): 71–74. [徐幼平, 徐秋芳, 蔡新忠, 2007. 适于双向电泳分析的番茄叶片总蛋白提取方法的优化. *浙江农业学报*, 19(2): 71–74.]
- Yan JX, Wait R, Berkelman T, Harry RA, Westbrook JA, Wheeler CH, Dunn MJ, 2000. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 21(17): 3666–3672.
- Yang QS, Wang Y, Zhang J, Shi W, Qian C, Peng XX, 2007. Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: cysteine synthase as a key player in Al response. *Proteomics*, 7(5): 737–749.
- Ye GY, Fang Q, 2011. Entomological research in the genomic age. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(6): 1531–1538. [叶恭银, 方琦, 2011. 基因组时代的昆虫学研究. *应用昆虫学报*, 48(6): 1531–1538.]
- Yi FP, Zhang PB, Chang PA, Song FZ, Li B, Fujii H, 2006. The application of two dimensional electrophoresis in the separation of proteins in *Bombyx mori*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(6): 873–876. [易发平, 张平波, 常平安, 宋方洲, 李斌, 藤井博, 2006. 双向电泳法在家蚕蛋白质分离中的应用. *昆虫知识*, 43(6): 873–876.]
- Yiou P, Shaoli A, Kebin L, Tao W, Kui F, Hua Z, Yu S, Xun Y, Jinqhui X, 2013. Evaluation of extraction procedures for 2-DE analysis of aphid proteins. *Journal of Separation Science*, 36(3): 532–539.
- Zhang NN, Xu Q, Li FL, Cheng LG, 2011. Establishment of a proteomic analysis system by 2- DE from adult *Plutella xylostella*. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition)*, 34(2): 78–82. [张娜娜, 许勤, 李凤良, 程罗根, 2011. 小菜蛾成虫蛋白质组双向电泳图谱的建立及条件优化. *南京师大学报(自然科学版)*, 34(2): 78–82.]
- Zhao N, Wang GY, Wang LS, Yang X, Li YH, 2011. Advances in research on key techniques of proteomics. *Letters in Biotechnology*, 22(4): 580–583. [赵楠, 王桂媛, 王玲妹, 杨雪, 李玉花, 2011. 蛋白质组学关键技术研究进展. *生物技术通讯*, 22(4): 580–583.]